

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación



FACULTAD DE
CIENCIAS

CIAL



***DISEÑO DE BEBIDAS DE USO ESPECÍFICO
PARA LA SALUD***

BEATRIZ AMADOR ROJO

Tesis doctoral

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

***DISEÑO DE BEBIDAS DE USO ESPECÍFICO
PARA LA SALUD***

Memoria presentada por:

Beatriz Amador Rojo

Para optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Marín Pródanov Pródanov

(Universidad Autónoma de Madrid)

Dr. Guillermo Reglero Rada

(Universidad Autónoma de Madrid)

A mis padres

A mis hermanos

A Alberto

GRACIAS

Al Dr. Guillermo Reglero, por permitirme iniciar mi carrera investigadora en el Grupo de Investigación en Ingredientes Alimentarios Funcionales de la UAM, así como por haber confiado en mí dirigiendo esta tesis doctoral.

Al Dr. Marín Pródanov, no sólo por su dirección en esta tesis, sino por su paciencia, disponibilidad, apoyo, predisposición para aceptar ideas, ¡sus ocurrencias!... y en definitiva por su aportación en esta etapa tanto científica como personal.

A la Dra. M^a Victoria Moreno Arribas, directora del CIAL, por permitirme disponer de los servicios ofrecidos por el centro.

A la Dra. Susana Santoyo, directora de la Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de doctorado.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador y a la financiación del Proyecto AGL 2007-64198/ALI del MICINN que me ha permitido realizar la presente Tesis doctoral.

A las Dras. Laura Jaime, por quien comencé en este “mundillo”, Tiziana Fornari y Mónica Rodríguez, por su disponibilidad y cercanía, y Montserrat González, por su paciencia, dedicación, compañerismo y amistad.

Al resto de profesores que forman parte de la Sección Departamental, por compartir su experiencia tanto en lo profesional como en lo personal.

A los compañeros de la Universidad de Braunschweig, por facilitar mis largas jornadas de trabajo y hacer de mi estancia una experiencia inolvidable.

A mis compañeros de “labo”, por los momentos que hemos pasado fuera y dentro (¡¡muuuchos más buenos que malos!!), su paciencia (que últimamente la he puesto a prueba!) y sobre todo su apoyo: Juanan, Ali, Gonzalo, María, Erika, Pilar, Ana, Maika, Inés, David, Dani, Guzmán, Óscar, Victor, Jose, Elvis, Luz, Sergio, y especialmente a Elena, que ha sido ante todo una amiga, incluso a kilómetros de distancia.

A todos mis amigos: del colegio, la facultad... por los buenos momentos, vuestra amistad y simpatía. Sory, Sara, Jose... ¡gracias por estar ahí para todo!

A mis hermanos, y mis tres sobrinos, por ser como son: lo mejor para desconectar de todo esto cuando lo necesitas! A mi familia de Mérida y Madrid; a los que ya no están pero de los que aprendí.

A Alberto, ¿cómo no ibas a estar aquí? ¡Si has “sufrido” esta última etapa casi tanto como yo! Gracias por tu comprensión, paciencia (mientras yo perdía la mía), cariño, apoyo (técnico incluido) y sobre todo, por estar a mi lado.

Por último, pero para mí lo más importante, a mis padres, a quienes dije que estudiaría sólo una diplomatura y aquí estoy, agradeciéndoles su gran contribución a esta tesis: por vuestro cariño, confianza, bondad, apoyo y por hacer de mí mejor persona cada día, gracias.

En definitiva, a todos los que han hecho posible de una manera u otra que esta Tesis doctoral haya salido adelante.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
PRESENTACIÓN	7
1. NECESIDAD DE LOS ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD	9
2. TIPOS DE ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD	10
3. DISEÑO DE ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	15
ESTRUCTURA DE LA MEMORIA	17
ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA	19
1. EL VINO COMO ALIMENTO	20
2. VINO Y SALUD	21
3. FENOLES PROCEDENTES DE LOS PRODUCTOS VINÍCOLAS	23
3.1. No flavonoides	24
3.1.1. Ácidos fenólicos	24
3.1.2. Estilbenos	25
3.2. Flavonoides	26
3.2.1. Flavonoles	28
3.2.2. Flavanonoles	29
3.2.3. Flavan-3-oles	29
3.2.4. Antocianos	31
4. FENOLES PROCEDENTES DEL LÚPULO	32

4.1. Flavonoides	33
4.1.1. Chalconas y flavanonas	33
5. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN PARA LA DESALCOHOLIZACIÓN DEL VINO	36
5.1. Desalcoholización de vino mediante Ósmosis Inversa	38
5.2. Desalcoholización de vino por extracción con fluidos supercríticos	39
5.2.1. Sistema de extracción	41
6. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PREPARATIVA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MATERIAS VEGETALES SÓLIDAS	42
7. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS	45
8. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPONENTES DEL VINO	50
8.1. Actividad antioxidante	50
8.1.1. Métodos HAT	51
8.1.2. Métodos SET	52
8.2 Estrés oxidativo, inflamación y enfermedad cardiovascular	53
8.2.1. Riesgo cardiovascular	54
8.2.2. Mediadores químicos implicados en el proceso inflamatorio	59

CAPÍTULO 1. MATERIAS PRIMAS: UVA. SELECCIÓN DE VARIEDADES DE ALTA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

OBJETIVO	63
INTRODUCCIÓN	65
MATERIALES Y MÉTODOS	67
1. UVAS	67
2. EXTRACTOS DE UVAS	68
2.1. Extractos acuosos	68
2.2. Extractos etanólicos	68
3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	69

4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE _____	69
4.1. Medida de la actividad antioxidante por el método del DPPH _____	69
4.2. Medida de la Actividad Antioxidante por el método del blanqueamiento del β -caroteno _____	70
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS _____	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	73
1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DPPH ____	73
1.1. Uva blanca _____	73
1.2. Uva tinta _____	76
2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DEL BLANQUEAMIENTO DEL B-CAROTENO _____	79
2.1. Uva blanca _____	79
2.2. Uva tinta _____	82
3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES ____	85
ANEXO _____	89

CAPÍTULO 2. MATERIAS PRIMAS: VINO. ESTUDIO DE PROCEDIMIENTOS DE REDUCCIÓN DEL CONTENIDO EN ETANOL

91

OBJETIVO _____	93
INTRODUCCIÓN _____	95
MATERIALES Y MÉTODOS _____	97
1. MUESTRAS Y REACTIVOS _____	97
2. MÉTODOS DE DESALCOHOLIZACIÓN POR SFE _____	97
2.1. Extracción de etanol con CO ₂ supercrítico en contracorriente _____	97
2.2. Recuperación del aroma _____	98

3. MÉTODO DE DESALCOHOLIZACIÓN POR OI _____	99
3.1. Permeabilidad al agua y al vino _____	100
3.2. Método de desalcoholización de vino por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales _____	100
3.3. Método de desalcoholización de vino por diafiltración discontinua con reducción de volumen _____	101
3.4. Métodos de análisis realizados en el control de desalcoholización mediante OI _____	102
4. ANÁLISIS DEL AROMA POR GC _____	102
5. ANÁLISIS SENSORIAL DEL VINO DESALCOHOLIZADO _____	103
6. ANÁLISIS DE ETANOL _____	103
7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE _____	104
7.1. Ensayo del DPPH _____	104
7.2. Ensayo del ORAC (Oxygen radical absorbance activity) _____	105
8. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES ____	105
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	106
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	107
1. DESAROMATIZACIÓN Y DESALCOHOLIZACIÓN MEDIANTE EXTRACCIÓN CON CO ₂ SUPERCRTICO (SFE) _____	107
1.1. Extracción de etanol _____	107
1.2. Extracción de aromas _____	108
2. DESALCOHOLIZACIÓN MEDIANTE ÓSMOSIS INVERSA _____	116
2.1. Desalcoholización por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales _____	123
2.1.1. Procedimiento de trabajo _____	123
2.1.2. Seguimiento de los parámetros de operación _____	123
2.1.3. Seguimiento de la transferencia de materia _____	124
2.2. Desalcoholización por diafiltración discontinua con reducción de volumen _____	129
2.2.1. Procedimiento de trabajo _____	129

2.2.2. Seguimiento de los parámetros de operación _____	130
2.2.3. Seguimiento de la transferencia de materia _____	131
3. DESALCOHOLIZACIÓN POR PROCEDIMIENTOS MIXTOS _____	138
3.1. Separación del aroma del vino rosado. Etapa 1 _____	138
3.2. Desalcoholización. Etapa 2 _____	139
3.2.1. Eliminación de etanol mediante SFE del refinado obtenido _____	139
3.2.2. Eliminación de etanol mediante OI del refinado obtenido. _____	140
3.3. Preparación del vino base para la elaboración de una bebida funcional _____	140
3.4. Análisis sensorial del vino desalcoholizado _____	141
3.5. Análisis de aromas del vino rosado desalcoholizado por SFE _____	143
3.6. Determinación de actividad antioxidante _____	145
ANEXO _____	147
1. FICHA DE CATA. AROMAS _____	147
2. FICHA CATA. SABORES _____	148
3. FICHA CATA. COLOR _____	149
 <i>CAPÍTULO 3. MATERIAS PRIMAS: LÚPULO. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PRENILFLAVONOIDES</i> _____	 151
OBJETIVO _____	153
INTRODUCCIÓN _____	155
MATERIALES Y MÉTODOS _____	157
1. MATERIAL VEGETAL _____	157
2. REACTIVOS _____	157
3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN _____	157
3.1. Extracción sólido-líquido a temperatura ambiente y presión atmosférica _____	157
3.2. Extracción sólido-líquido en condiciones subcríticas _____	158

4. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS	159
4.1. HPLC-PAD	159
4.2. UHPLC-PAD-ESI-MS/MS	160
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	163
1. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO A TEMPERATURA AMBIENTE Y PRESIÓN ATMOSFÉRICA	163
2. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO EN CONDICIONES SUBCRÍTICAS	164
2.1. Análisis del extracto individual con agua como disolvente	167
2.2. Análisis del extracto individual con etanol como disolvente	168
2.3. Análisis de la extracción secuencial	169
2.3.1. Extracción con hexano	169
2.3.2. Extracción con etanol	170
2.3.3. Extracción con agua	171

CAPÍTULO 4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA: DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

OBJETIVO	177
INTRODUCCIÓN	179
MATERIALES Y MÉTODOS	181
1. MUESTRAS	181
2. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	182
2.1. Métodos de análisis mediante HPLC	182
2.1.1. Perfil de polaridades	182
2.1.2. Compuestos individuales	182
2.2. Método de análisis mediante HPLC-PAD-MS	183
3. REACTIVOS	184

4. SUSTANCIAS DE REFERENCIA _____	184
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	185
1. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR RP-HPLC SEGÚN SU PERFIL DE POLARIDADES _____	185
2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES DE BAJA MASA MOLECULAR POR RP-HPLC _____	191
2.1. Análisis de extractos acuosos _____	191
2.2. Análisis de extractos hidroalcohólicos _____	194
2.3. Identificación de compuestos fenólicos _____	197
 <i>CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL: EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA</i> _____	 205
OBJETIVO _____	207
INTRODUCCIÓN _____	209
MATERIALES Y MÉTODOS _____	211
1. ESTUDIOS IN VITRO _____	211
1.1. Muestras _____	211
1.2. Reactivos _____	211
1.3. Métodos _____	211
1.3.1. Cultivo celular _____	211
1.3.2. Ensayo de citotoxicidad _____	212
1.3.3. Ensayo de bioactividad _____	213
1.3.4. Ensayo ELISA para la cuantificación de citoquinas _____	213
1.3.5. Análisis estadístico _____	214
2. ESTUDIOS IN VIVO _____	214
2.1. Elaboración de la bebida funcional _____	214

2.2. Descripción del modelo	214
2.3. Obtención de muestras	216
2.4. Parámetros a determinar	216
2.4.1. Perfil lipídico	216
2.4.2. Determinación de la Peroxidación Lipídica	216
2.4.3. Actividad enzimática Óxido Nítrico Sintetasa (NOS)	217
2.5. Estudio estadístico	217
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	219
1. ESTUDIOS IN VITRO	219
1.1. Citotoxicidad del extracto de lúpulo	219
1.2. Actividad antiinflamatoria del extracto de lúpulo	220
2. ESTUDIOS IN VIVO	224
2.1. Parámetros físicos	224
2.2. Marcadores del perfil lipídico y del metabolismo de la glucosa	225
2.2.1. Perfil lipídico	225
2.2.2. Metabolismo de la glucosa	226
2.3. Niveles de peroxidación lipídica	228
2.4. Producción de óxido nítrico	231
CONCLUSIONES FINALES	235
BIBLIOGRAFÍA	241

RESUMEN

Son muy numerosas las investigaciones realizadas sobre el potencial saludable del vino. En la bibliografía internacional se encuentran diversas referencias de trabajos, tanto de intervención como de observación, cuyos resultados demuestran que sus componentes ejercen funciones que se relacionan indiscutiblemente con efectos preventivos en el desarrollo de alteraciones que conducen a ciertas enfermedades crónicas, siendo las más estudiadas las relacionadas con el sistema cardiovascular.

Aunque algunos autores consideren el efecto positivo que el etanol presente en el vino pudiera tener sobre la reducción del riesgo cardiovascular, la mayor parte de la comunidad científica conviene en afirmar que los compuestos fenólicos del vino, variados y abundantes, tienen un papel relevante en la reducción o mejora de los principales factores del riesgo cardiovascular, a través de funciones antioxidantes y antiinflamatorias.

Tomando como base este conocimiento y teniendo en cuenta la honda importancia social y económica del vino en muchos países del mundo, entre los que se encuentra España, parece de razonable interés plantearse el diseño de bebidas de uso específico para la salud a partir de vino. Para ello, aún es necesario avanzar en el conocimiento de los procedimientos y métodos necesarios. El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral se orienta en esa dirección. Mediante el estudio de materias primas, de tecnologías y de metodologías se ha tratado de aportar herramientas útiles para el desarrollo de una bebida que, consumida como parte de la dieta, pueda aportar beneficios a la salud cardiovascular.

Se ha partido de la hipótesis de que, debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, son los compuestos fenólicos y no el etanol, los responsables de los posibles efectos saludables buscados. El plan de trabajo ha incluido el estudio de la materia prima, es decir la uva, y la selección de la variedad más idónea, desde el punto de vista de su actividad biológica. Para reforzar el efecto asociado al contenido fenólico de la uva se ha planteado la posibilidad de complementar los aportados por la uva con compuestos procedentes de otras especies. Así, se ha estudiado la aportación de prenilflavonoides obtenidos a partir del lúpulo, materia prima también familiar en el ámbito alimentario.

La caracterización química y funcional de materias primas e ingredientes es esencial en el desarrollo de productos alimenticios para la salud. Por ello, en este trabajo de Tesis Doctoral se han incluido también desarrollos de metodologías cromatográficas para el análisis de polifenoles y se han aplicado procedimientos de evaluación de la actividad biológica *in vitro*, a través de modelos celulares, así como *in vivo*, mediante modelos animales de experimentación.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASE:	Extracción acelerada con disolvente
C:	catequina
CE:	Conductividad eléctrica
CF:	Compuestos fenólicos
COX:	Ciclooxigenasa
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC:	Eepicatequina
ECG:	Epicatequin-galato
ECV:	Enfermedad cardiovascular
EGC:	Epigalocatequina
ER:	Receptor estrogénico
GAE:	Equivalentes de ácido gálico
HAT:	Transferencia de un átomo de hidrógeno
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
IL:	Interleuquina
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
IPT:	Índice de Polfenoles Totales
IX:	Isoxanthohumol
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
MDA:	Malonaldehído
OI:	Osmosis Inversa
OPACs:	Oligómeros de proantocianidinas
ORAC:	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
ox-LDL:	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
PACs:	Proantocianidinas
PC:	Procianidina

PG: Prostaglandina

PLE: Extracción con líquidos presurizados

PN: Prenilnaringenina

ROS: Especies Reactivas del oxígeno

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

SET: Sistema de transferencia de electrones

SFE: Extracción por fluidos supercríticos

STSA: Sólido totales solubles en agua

SWE: Extracción con agua subcrítica

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

TEAC: Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox

TNF: Factor de necrosis tumoral

VR-SD'08: Vino Rosado semidulce; cosecha 2008.

XN: Xanthohumol

INTRODUCCIÓN

PRESENTACIÓN

El concepto de alimentos saludables es genérico y se puede atribuir a todo tipo de productos alimenticios, desde los más tradicionales hasta los más novedosos. Sin embargo, conviene hacer énfasis en que los tradicionales son saludables solo en el contexto de una dieta correcta y que hay que distinguirlos de los alimentos diseñados específicamente para contribuir a mejorar algún aspecto concreto de la salud humana.

El interés actual en los alimentos funcionales comenzó en Japón como una medida de mejora de la salud de su población, mermada como consecuencia de los efectos de la II Guerra Mundial, y de reducción del drenaje de la economía causado por el rápido aumento de los costes del sistema de salud. En 1984 el Ministerio de Educación, Ciencia y Cultura, respaldó un Proyecto Nacional sobre Alimentos Funcionales para estimular su desarrollo. En 1986, el Ministerio Japonés de Salud y Bienestar convocó un Foro de Alimentos Funcionales con seis expertos en Alimentos y Nutrición, cuya conclusión fue la propuesta de métodos para mejorar la salud de la población mediante el uso de los alimentos funcionales. En 1990, como resultado de un informe del Comité de Estudio de los Alimentos Funcionales, el Ministerio Japonés de Salud y Bienestar emitió un decreto por el cual se aprobaron los “*Alimentos de Uso Específico para la Salud*” (Foods for Specific Health Use, FOSHU), denominación legal para los alimentos funcionales, haciéndose efectivo en Septiembre de 1991.

FOSHU consiste en el reconocimiento con una marca específica de aquellos alimentos que conteniendo ingredientes bioactivos aporten un efecto saludable basado en criterios demostrables.

En Europa y Norte América, el interés por el concepto de alimentos funcionales surgió a raíz de la evidencia científica de la relación entre salud y dieta, y estimulados por el interés japonés en los alimentos funcionales. Hasta los primeros años de la década de los 80, los estudios de Nutrición se enfocaron principalmente hacia las enfermedades producidas por déficit de nutrientes, mientras que desde entonces, estos estudios se han enfocado más hacia el potencial preventivo de ciertos alimentos o, más frecuentemente, de ciertos tipos de dietas. Es el aspecto preventivo de la Nutrición lo que dio nacimiento al concepto de alimentos funcionales.

La iniciativa del Gobierno de Japón hizo plantearse a los gobiernos de otros países, a los consumidores, a los empresarios y a los científicos de los países más desarrollados la conveniencia o la necesidad de distinguir en el mercado los alimentos de uso específico para la salud. Por ello, en la segunda mitad del siglo XX surgieron los conceptos de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos. El término “Nutracéutico” fue popularizado por la Fundación para la Innovación en Medicina y se refiere a “cualquier sustancia que puede ser considerada como alimento o parte de un alimento y proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades”.

El Codex Alimentarius adoptó Directrices generales sobre declaraciones de propiedades saludables en 1991 y Directrices para el uso de declaraciones nutricionales en 1997; estas últimas fueron modificadas por la Comisión en 2004 y enmendadas por última vez en 2011 (Codex Alimentarius, 2012).

En la actualidad, las Ciencias de la Alimentación, además de satisfacer las necesidades nutricionales, de higiene y de seguridad alimentaria, se preocupan cada vez más por la salud y el medio ambiente. En los últimos años ha crecido el interés de los consumidores por conocer la relación entre dieta y salud y por identificar los componentes beneficiosos de la dieta. Esta sensibilización de la población influye en distintos ámbitos, como son la investigación y la educación nutricional, y tiene también consecuencias en la industria alimentaria, sobre la producción agrícola y sobre las tecnologías de la producción de alimentos. Debido a esta preocupación, el mercado de los alimentos funcionales es un sector que se encuentra en continua expansión y que presenta un carácter altamente dinámico. En respuesta a esta expansión, la Unión Europea creó una comisión de acción concertada sobre la ciencia de los alimentos funcionales en Europa (Commission's Concerted Action on Functional Food Science in Europe, FUFOSE) coordinada por el “International Life Science Institute” (ILSI), que elaboró un documento de consenso sobre estudios científicos de los alimentos funcionales en Europa. De esta Acción Concertada resultó la primera definición de Alimento Funcional aceptada en Europa con carácter general: “Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo humano de modo que mejora el estado de salud y reduce el riesgo de contraer enfermedad”.

1. NECESIDAD DE LOS ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD

La ciencia de la Nutrición aporta los conocimientos necesarios para elaborar dietas adecuadas a muy diferentes situaciones fisiológicas de modo que se pueda mantener un buen estado de salud. Por ello, hay numerosos nutricionistas y dietistas que defienden que no es necesario desarrollar alimentos de uso específico para la salud ya que es suficiente con disponer de los alimentos tradicionales y combinarlos en dietas equilibradas. Una parte de la población, más o menos numerosa según los países, está de acuerdo con esta postura principalmente debido a las campañas de las asociaciones de consumidores que se han posicionado en contra, poniendo en duda la relación beneficio/coste de los alimentos de uso específico para la salud.

Pero hay que tener en cuenta que seguir una dieta equilibrada no es sencillo ya que requiere tener ciertos conocimientos de Nutrición y de las propiedades y composición de los alimentos. Requiere contar con el tiempo necesario para abastecerse de alimentos adecuadamente y de voluntad y disciplina suficientes para poder seguir una dieta bajo parámetros correctos, con continuidad. Además, ya se sabe que la dieta adecuada tiene componentes de individualidad atribuibles a las características genéticas de cada persona.

Los alimentos de uso específico para la salud pueden ser la mejor herramienta de los nutricionistas-dietistas y de los médicos para conseguir dietas adecuadas a todo tipo de situaciones fisiológicas, ya que permiten aumentar el catálogo de alimentos utilizables, de manera que se incorporen a la dieta nutrientes esenciales y productos con actividades saludables y al mismo tiempo, se retiren o disminuyan los ingredientes menos recomendables.

Se trata, además, de herramientas nutricionales diseñadas bajo parámetros científicos avanzados y evaluadas en cuanto a su efectividad y seguridad, ya que para su comercialización los alimentos funcionales deben cumplir normas bien establecidas en reglamentos específicos de diversos países.

Las regulaciones de la Unión Europea (EFSA; <http://www.efsa.europa.eu/>), Estados Unidos (FDA; <http://www.fda.gov/>), Japón (FOSHU; <http://www.foshu.com/>), Australia y Nueva Zelanda (Foodstandards; <http://www.foodstandards.gov.au/>) son

las que proporcionan las mejores referencias para establecer una clasificación rigurosa de los productos alimentarios. Aunque, como se ve, no existe una única normativa internacional, el fenómeno de la globalización provoca una inevitable tendencia a la armonización.

Actualmente, la regulación europea relativa a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos se recoge en el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006, con fecha de aplicación de todos los estados miembros desde el 1 de julio de 2007. En dicho reglamento se reconoce a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como el organismo de evaluación de las bases científicas sobre las que se pretendan sustentar las alegaciones. Este organismo debe trabajar en coordinación con los organismos homólogos de los países miembros, siendo en el caso de España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), Organismo Autónomo adscrito al Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad cuya misión es garantizar el más alto grado de seguridad alimentaria, coordinando las actuaciones de las administraciones públicas españolas competentes en materia de seguridad alimentaria y nutrición.

2. TIPOS DE ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD

Bien en forma de alimentos tradicionales a los que se incorporan ingredientes bioactivos o en presentaciones típicas de los productos farmacéuticos, hoy en día, alrededor de la tercera parte del mercado alimentario de los países más desarrollados está constituido por alimentos de uso específico para la salud. Se trata de los Alimentos Funcionales, los Dietéticos o productos destinados a una alimentación especial y los Complementos Alimenticios. El etiquetado y la comercialización de estos tres tipos de alimentos están regulados por normas específicas.

- **Alimentos Funcionales:** alimentos a los que se han añadido uno o varios ingredientes bioactivos (generalmente pocos), no contenidos de forma natural en el alimento en cuestión (o contenidos en muy baja cantidad), que poseen una determinada actividad biológica capaz de afectar de modo positivo al desarrollo de los mecanismos biológicos corporales relacionados con ciertas enfermedades,

fundamentalmente cardiovasculares, inflamatorias, neurodegenerativas y tumorales, y desórdenes metabólicos.

- **Dietéticos:** son productos destinados a una alimentación especial para determinadas situaciones fisiológicas y para usos médicos.
- **Complementos Alimenticios:** productos alimenticios cuyo fin es complementar la dieta normal y que consiste en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias.

3. DISEÑO DE ALIMENTOS DE USO ESPECÍFICO PARA LA SALUD

El diseño de Alimentos de Uso Específico para la Salud es una actividad multidisciplinar compleja. Con la premisa de cumplir con la normativa que los regula, son muy numerosos y variados los estudios que es preciso realizar. A modo de ejemplo se pueden mencionar los siguientes:

- Diseño de los procesos de obtención de los ingredientes bioactivos
- Caracterización química de los ingredientes.
- Caracterización *in vitro* de la actividad biológica de los ingredientes: actividad en cultivos celulares.
- Biodisponibilidad del ingrediente solo y en la matriz alimentaria.
- Diseño del alimento funcional: aceptabilidad, calidad y seguridad.
- Estudios preclínicos en animales de experimentación.
- Estudios clínicos, proteómica, metabolómica.
- En el presente, pensando en un futuro cercano de personalización de la alimentación: Genómica nutricional (Nutrigenómica y Nutrigenética).

En este contexto, el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha orientado hacia el estudio de los aspectos que determinan el diseño de una bebida de uso específico para la salud elaborada a partir de vino y lúpulo. Ha formado parte del proyecto de investigación AGL2007-64198 financiado por el Plan Nacional de I+D en la

convocatoria de Proyectos de Investigación Fundamental no Orientada. Por ello, este trabajo ha enfatizado de manera particular en el estudio de métodos, procedimientos y tecnologías útiles para el diseño de la bebida saludable sin pretender culminar la obtención de dicha bebida, que es realmente un objetivo que se sitúa más en el ámbito del desarrollo tecnológico.

HIPÓTESIS

En la bibliografía internacional existen numerosas referencias que demuestran dos aspectos clave para el planteamiento de un procedimiento de elaboración de una bebida funcional a partir de vino:

1. El etanol a dosis altas tiene un efecto pernicioso para la salud cardiovascular pero no a bajas concentraciones; por tanto, para elaborar una bebida saludable a partir de vino sería conveniente eliminarlo en su mayor parte, pero no en su totalidad.
2. Los polifenoles son los responsables mayoritarios del efecto cardiosaludable del vino, aunque su tipo y concentración no son suficientes para obtener efectos claramente sensibles y por tanto concluyentes.

Por tanto, la hipótesis del presente trabajo de Tesis Doctoral consiste en la consideración de que una bebida obtenida a partir de vino desalcoholizado hasta una pequeña cantidad residual de etanol y enriquecida con prenilflavonoides del lúpulo, puede ser un producto alimenticio de uso específico para la salud con efecto en la reducción del riesgo cardiovascular.

Desde el punto de vista científico-técnico el planteamiento del presente trabajo de Tesis Doctoral incluye el enfoque de que los prenilflavonoides del lúpulo pueden potenciar el efecto cardiosaludable de los polifenoles del vino. La combinación de técnicas de membrana con técnicas de extracción sub y supercrítica es adecuada para obtener la bebida funcional efectiva y con propiedades sensoriales parecidas a las tradicionales del vino.

El trabajo ha consistido en primer lugar en el estudio de las materias primas. Se han seleccionado las variedades más idóneas en cuanto a su potencial de aportar actividad antioxidante. Se ha tratado de reforzar el efecto de los polifenoles de la uva mediante la aportación de extractos de lúpulo ricos en prenilflavonoides. Se ha trabajado en la caracterización química y funcional, aspecto esencial en el desarrollo de ingredientes y productos de uso para la salud. Se han desarrollado también métodos cromatográficos para el análisis de polifenoles y se han aplicado procedimientos de evaluación de la actividad biológica tanto *in vitro*, a través de modelos celulares, como *in vivo* mediante experimentación animal.

OBJETIVOS

El presente trabajo de Tesis Doctoral se enmarca en el contexto del Proyecto AGL2007-64198, financiado por el Plan Nacional de I+D en la convocatoria 2007 de Proyectos de Investigación Fundamental no Orientada, así como en el Programa de Formación de Personal Investigador asociado a la convocatoria mencionada.

Dentro de este contexto, el **objetivo general** del trabajo ha sido contribuir a la metodología y procedimientos necesarios para el diseño de productos de uso específico para la salud, aplicados concretamente al caso de una bebida cardiosaludable obtenida a partir de vino. Dado el carácter de las convocatorias en las que se enmarca el trabajo, no se ha abordado el desarrollo completo de la bebida, que constituye un objetivo propio de otros tipos de proyectos de I+D, sino que solamente se ha evaluado un modelo de la misma.

El objetivo general incluye el estudio de materias primas, tecnologías de obtención y metodologías de caracterización química y funcional.

Para tender hacia el objetivo general, se establecieron una serie de **objetivos específicos**, relacionados a continuación:

1. Estudiar la actividad antioxidante de diferentes variedades de uva con el fin de seleccionar aquellas más idóneas para elaborar vinos de alta actividad biológica.
2. Estudiar procedimientos de reducción del contenido en etanol del vino que afecten lo menos posible a sus características sensoriales.
3. Estudiar procedimientos de obtención de extractos de lúpulo ricos en polifenoles complementarios a los que contiene el vino.
4. Perfeccionar la metodología analítica para la caracterización química de los componentes bioactivos de los productos en estudio.
5. Realizar una evaluación preliminar de la actividad cardiosaludable potencial de un modelo de bebida diseñada según las herramientas desarrolladas en el presente trabajo de Tesis Doctoral con el fin de realizar una aproximación a la validación de dichas herramientas.

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

La Memoria se ha estructurado en cinco capítulos, siguiendo los objetivos específicos del trabajo:

- Capítulo 1.** Materias primas: Uva. Selección de variedades de alta actividad antioxidante.
- Capítulo 2.** Materias primas: Vino. Estudio de procedimientos de reducción del contenido en etanol.
- Capítulo 3.** Materias primas: Lúpulo. Obtención de extractos de prenilflavonoides
- Capítulo 4.** Caracterización química: Desarrollo de métodos de análisis de los compuestos bioactivos.
- Capítulo 5.** Caracterización funcional: Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad biológica.

Además de los capítulos, la memoria contiene un apartado de Antecedentes y estado actual del tema, en el que se plantea de modo general y común el contexto científico-técnico en el que se sitúa el trabajo. Igualmente, al final de la memoria se incluye un apartado con las conclusiones más relevantes para los objetivos planteados, así como las referencias bibliográficas del trabajo.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

España es uno de los grandes productores mundiales de vino: primero en el ranking por superficie plantada, tercero por producción (debido a un rendimiento menor que el de Francia e Italia) y segundo exportador mundial en términos de volumen, aunque tercero en términos de valor. Su importancia en términos económicos, sociales y medioambientales, sin olvidar su papel como imagen exterior del país, es un exponente de la extraordinaria relevancia del sector vitivinícola en España.

En 2010 la superficie vitícola mundial disminuyó en 65.000 ha respecto a 2009. El viñedo comunitario total (UE-27) está reduciendo progresivamente su superficie plantada, pasando de 3.884.000 ha en el año 2006 a 3.630.000 ha en el año 2010. Este proceso es consecuencia de la combinación de factores como la reestructuración del viñedo y el impacto de la crisis vitícola, que por otra parte, se ha dejado sentir de forma distinta por zonas y tipos de vino.

España, con 1.082 millones ha destinadas al cultivo de la vid (97.4% destinadas a vinificación, un 2% a uva de mesa, un 0.3 % a la elaboración de pasas y un 0.3 % restante a viveros), sigue siendo el país con mayor extensión de viñedo de la Unión Europea y del mundo. Su tradición elaboradora de vinos se remonta a la época de los romanos, aunque no ha sido hasta más recientemente cuando la exportación se ha convertido en un hecho masivo y generalizado en el sector. La vid ocupa el tercer lugar en extensión de los cultivos españoles, detrás de los cereales y el olivar.

La producción de vino en España es de 35 millones de hL (ICEX, 2011). Sin embargo, esta producción se mantiene con una superficie de cultivo cada vez más reducida, debido a la estrategia europea de arranque de viñedos adoptada para reducir los excedentes de vino en la última década. España ha eliminado un total de 94.004 ha de viñedo desde agosto de 2008 (OEMV, 2011a).

Según la OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), hay un descenso del consumo de vino desde 2004 (OIV, 2011), con la excepción de los vinos de elevada calidad, cuyo consumo se ha mantenido constante, e incluso ha experimentado un cierto crecimiento. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la tendencia del consumo de otros productos elaborados con vino, como la sangría y otras bebidas tipo cocktail (OEMV, 2011b). Hace 3 años en el mercado español

apareció un nuevo tipo de bebida derivada del vino: el vino desalcoholizado. Debido a la reciente incursión de esta bebida en el mercado, aún no hay datos claros de su aceptación, pero se intuye que va en aumento, a pesar de su poca competitividad, organolépticamente hablando, con los vinos de calidad.

Otra alternativa de diversificación de los productos obtenidos del vino, que todavía no se encuentra en el mercado es la elaboración de bebidas funcionales a base de este vino desalcoholizado.

1. EL VINO COMO ALIMENTO

En áreas rurales de viticultura, el vino ha sido una de las mayores fuentes de energía metabólica para la población adulta, por lo que desde siempre, se ha considerado un alimento.

El vino contiene pequeñas cantidades de vitaminas, particularmente del grupo B, como B1 (tiamina), B2 (riboflavina) y B12 (cobalamina). Sin embargo, carece de vitaminas A, C, E y K. El vino contiene diversos minerales en formas fácilmente asimilables, principalmente potasio y hierro. No obstante, un consumo excesivo puede interferir en la absorción de calcio, selenio, magnesio y zinc, e incrementar la secreción renal de zinc. El bajo contenido en sodio, y elevado en potasio del vino hace que sea una de las fuentes de potasio más efectivas en personas que toman diuréticos.

El vino también tiene beneficios indirectos en la digestión de alimentos. Estimula la producción de jugos gástricos (ya que aumenta la liberación de la hormona gastrina) y abre el apetito (pero de este último no se conoce su mecanismo). Además, el etanol activa la liberación de la bilis en el intestino. Los ácidos y compuestos aromáticos del vino inducen los mismos efectos. Por tanto, el consumo moderado, además de ayudar en la digestión de alimentos hace que los jugos gástricos inactiven las enzimas implicadas en la formación de úlceras. Más importante, incluso, sería el efecto de los componentes del vino sobre la bacteria *Helicobacter pylori* (considerada la principal causa de úlcera de estómago) ya que su consumo moderado parece tener un efecto profiláctico limitando su desarrollo.

El vino puede potenciar la biodisponibilidad de nutrientes ya que algunos de sus componentes se combinan con iones metálicos, vitaminas y ácidos grasos, lo que facilita el transporte de estos compuestos a través de la pared intestinal.

Por último, el consumo de vino con los alimentos tiene el beneficio añadido de reducir la tasa de absorción de alcohol en la sangre. Más del 80 % del alcohol absorbido se transporta a través de la pared intestinal. Por ello, aumentando el tiempo que el vino permanece en el estómago, el consumo de alimentos ralentiza la absorción de alcohol. Como consecuencia, el hígado tiene más tiempo para metabolizar el etanol y la concentración máxima alcanzada en la sangre será aceptablemente baja. La tasa de metabolismo difiere considerablemente entre los individuos, variando entre los 90 y 130 mg/kg/h (Jackson, 2000).

2. VINO Y SALUD

En los últimos 20 años, la bibliografía internacional recoge numerosos artículos sobre estudios epidemiológicos que tratan de establecer las bases fisiológicas de la asociación entre vino y salud (Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Natella y col., 2001; Sun y col., 2002). La mayoría de ellos demuestran ciertos efectos protectores del vino frente a enfermedades cardiovasculares (ECV). Tales efectos han sido la base de la internacionalmente conocida “Paradoja Francesa”, que sugiere que, a pesar de una alta ingesta de grasas saturadas, los franceses muestran una baja incidencia de mortalidad por ECV. Esto se atribuye en gran medida al consumo de vino tinto (Anónimo, 1993; Fuhrman y col., 1995).

Desde hace mucho tiempo se mantiene la controversia sobre si las propiedades cardiosaludables del vino se deben al etanol o a la fracción polifenólica. Algunos autores defienden lo primero, debido a los efectos del etanol en el incremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Parker y col., 1996; McDonough, 2003) y su repercusión en diversos factores hemostáticos y en la función endotelial (Belleville, 2002; Abou-Agag y col., 2005). Pero, por el contrario, también es bien conocido que el etanol actúa como oxidante en diversas rutas metabólicas (Kono y col., 2000; Wu y Cederbaum, 2003).

Mann y Folts (2004) proporcionan una interesante revisión sobre este tema. Estos autores consideran que los mecanismos que contribuyen a la iniciación y progreso de la arteriosclerosis, son mecanismos con puntos finales específicos que pueden ser medidos directamente; y que en el otro extremo se encuentran los estudios epidemiológicos, que sugieren un efecto beneficioso asociado al consumo moderado de bebidas alcohólicas. Sin embargo, estos autores, al medir los puntos finales específicos relacionados con la aterogénesis, concluyen que las bebidas alcohólicas con mayores contenidos en polifenoles ofrecen mayor protección frente a la arteriosclerosis que el etanol por sí solo.

Schroder y col. (2006) han obtenido resultados que correlacionan la asociación entre el consumo de etanol a niveles tan bajos como 10 g/día, y el incremento de los niveles circulatorios de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL), siendo independiente de que la bebida alcohólica sea vino, cerveza o un licor. Al etanol se le atribuyen efectos antiagregante plaquetario y capacidad de incrementar los niveles de HDL.

Muchos investigadores consideran que es improbable que el contenido de etanol sea el único responsable de estos efectos; por ello, han enfocado su atención en otros constituyentes de las bebidas alcohólicas, que podrían ser los responsables. El efecto protector del vino tinto se ha propuesto partiendo del hecho de que además de su contenido en alcohol, contiene más compuestos fenólicos que cualquier otra bebida alcohólica. (Wollny y col., 1999; Frankel y col., 1993; Nigdikar y col., 1998; Caccetta y col., 2000; Miyagi y col., 1997; Pellegrini y col., 1996; Keevil y col., 2000; Stein y col., 1999).

Diversos estudios demuestran que, en comparación con otras bebidas alcohólicas como las espirituosas, cerveza y vino blanco, el vino tinto es el más beneficioso para reducir el riesgo de ECV y mortalidad en general (Klatsky y col., 1986; Klatsky y Armstrong, 1993; Criqui y Ringel, 1994; Gronbaek y col., 1995). Los escasos estudios médicos de intervención, en los que se evalúa el efecto del vino en el estrés oxidativo, muestran un efecto positivo del vino tinto frente a una casi ausencia de este efecto en blanco (Pignatelli y col., 2006).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta también que el etanol contribuye a la estabilidad de los polifenoles del vino favoreciendo su solubilidad y biodisponibilidad (Scalbert y

col., 2002; Gonthier y col., 2003; Manach y col., 2004; Estruch, 2000; Mann y Folts, 2004).

Las publicaciones que relacionan el efecto saludable del vino con su contenido en compuestos fenólicos antioxidantes son mayoritarias (Akçay y col., 2004; Fernández-Mar y col., 2012; Yu y col., 2012). Los principales compuestos fenólicos presentes en las uvas y en los vinos son ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos y derivados, antocianos, flavonoles, flavanoles (catequinas y proantocianidinas) y estilbenos (resveratrol, viniferin, piceid). Muchos de ellos poseen capacidad de neutralizar radicales libres y de acomplejamiento de metales de transición. Son conocidos como buenos antioxidantes lipídicos y se ha descrito que ejercen efectos antiinflamatorios y que actúan como protectores de las LDL frente a la oxidación. Sin embargo, queda mucho por estudiar acerca de los mecanismos de su actividad *in vivo*, ya que aún no se conoce lo suficiente sobre su biodisponibilidad y metabolismo (Cerdá y col., 2003).

Uno de los efectos antioxidantes de la fracción polifenólica del vino más conocidos es la disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esto resulta de la inhibición de las lipooxigenasas, además de la captación de radicales libres de oxígeno y la quelación de hierro (implicado en la formación de radicales).

En relación con lo mencionado hasta el momento, es interesante poner de manifiesto que el estudio del efecto del vino como protector de daños al DNA mediados por especies oxígeno reactivas (ROS) es una línea de investigación emergente sobre la relación vino y salud. Los daños al DNA están asociados a enfermedades crónicas no transmisibles (Lu y col., 2004). Los estudios realizados hasta el momento en esta línea, establecen una cierta relación entre el efecto protector del vino y la oxidación del DNA atribuible a los compuestos fenólicos; no obstante, queda mucho trabajo por hacer, ya que los resultados aún no son concluyentes (Greenrod y col., 2005).

3. FENOLES PROCEDENTES DE LOS PRODUCTOS VINÍCOLAS

El estudio de los compuestos fenólicos de la uva interesa desde hace décadas a los investigadores, por su influencia sobre las características organolépticas de la uva y el vino (color, astringencia, amargor, etc.) (Robards, y Antolovich, 1997; Dixon y col.,

2005; Kennedy y col., 2006; Aron y Kennedy., 2008) y su función sobre el desarrollo de la planta de la vid (Aron y Kennedy., 2008), así como por las propiedades anticancerígenas, vasodilatadoras, antiinflamatorias, antiolesterolémicas, antibacterianas y antioxidantes que se les atribuyen.

Los primeros avances en el estudio de estos compuestos se deben a Ribéreau-Gayon (1964), siendo posteriormente objeto de numerosas investigaciones, que siguen profundizando en el conocimiento sobre su síntesis, distribución y propiedades.

Los compuestos fenólicos en la uva, se encuentran básicamente en las partes sólidas: hollejos, semillas y raspón (12 %, 65 % y 22 %, respectivamente), mientras que en la pulpa tan solo suponen un 1 % (Hidalgo Togores, 2003), siendo los principales compuestos fenólicos las proantocianidinas (PACs) (Sánchez Álvarez, 2000). A continuación se describen las familias de fenoles más frecuentemente encontrados en la uva.

3.1. No flavonoides

3.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos hidroxibenzoicos y algunos de sus derivados se encuentran con mayor frecuencia en los hollejos y el mosto. Los más representativos de este subgrupo son los ácidos *p*-hidroxibenzóico ($R_1=H$, $R_2=H$), siríngico ($R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$), gálico ($R_1=OH$, $R_2=OH$), elágico, etc (Figura 1). En los vinos, el ácido gálico es uno de los compuestos fenólicos más abundantes: 65-165 mg/L en tintos y 4-11 mg/L en blancos.

Los ácidos hidroxicinámicos se acumulan tanto en las vacuolas celulares de la pulpa del grano de uva como en los hollejos (Cheynier y Fulcrand, 2003). Dentro de este subgrupo están el ácido *p*-cumárico ($R_1=H$, $R_2=H$), el ácido ferúlico ($R_1=OCH_3$, $R_2=H$) y el ácido cafeico ($R_1=OH$, $R_2=H$) (Figura 1). Los contenidos son de 2 a 100 veces más elevadas en el hollejo que en la pulpa, según la variedad, y su concentración disminuye durante el desarrollo de la baya, estabilizándose en la madurez (Romeyer y col., 1983). En vinos, el ácido cafeico se encuentra en concentraciones relativamente bajas tanto en tintos (5-13 mg/L) como en blancos (1-4 mg/L) (Frankel y col., 1995).

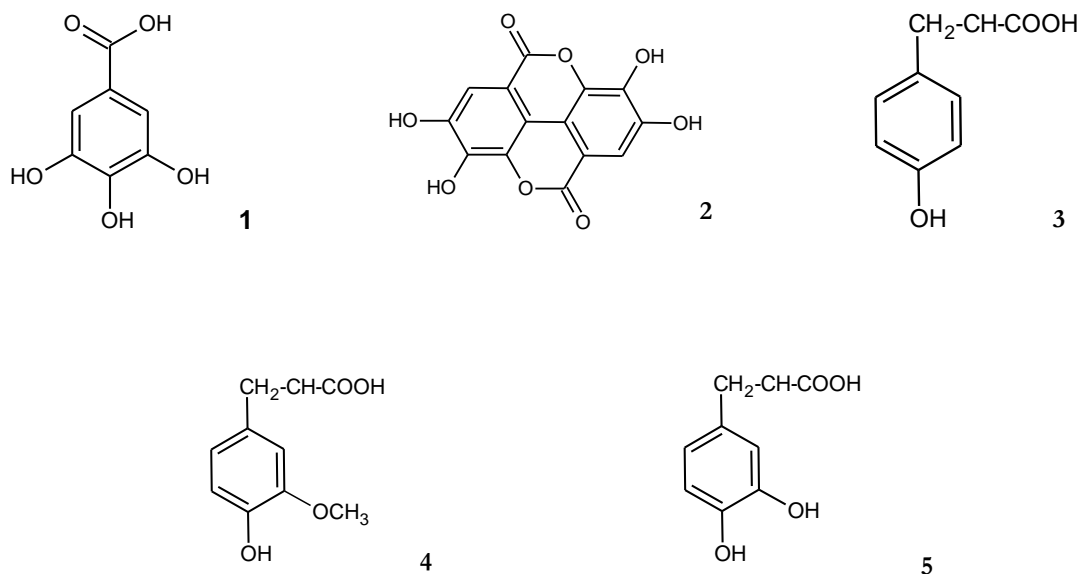


Figura 1. Estructuras químicas de los principales ácidos fenólicos y derivados presentes en los hollejos de uva: ácido gálico (1), ácido elágico (2), ácido p-cumárico (3), ácido felúrico (4) y ácido cafeico (5)

3.1.2. Estilbenos

Se encuentran principalmente en el hollejo, las hojas, el raspón y las ramas de la vid (Ector y col., 1996). Uno de los estilbenos más estudiados es el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) (Waterhouse y Lamuela-Raventos, 1994), debido a las propiedades antioxidantes, anticancerígenas y protectoras del sistema circulatorio, que se le atribuyen. La estructura química del *trans*-resveratrol se muestra en la figura 2. El resveratrol está presente en el hollejo en contenidos muy bajos, del orden de 5-10 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco en uvas maduras. Esta concentración varía según la cepa, siendo la variedad Pinot Noir particularmente rica en *trans*-resveratrol (puede contener hasta 20 $\mu\text{g/g}$) (Goldberg y col., 1995). En la uva se puede encontrar, además, en otras formas glicosiladas, generalmente con glucosa, como son la: piceida, astringina, resveratrolósido, etc. (Llaudy Fernández, 2006). Cabe destacar, que el *trans*-resveratrol es muy frágil a la radiación UV, transformándose fácilmente en la forma *cis*.

El resveratrol juega un rol importante en la resistencia de la vid frente al ataque de microorganismos, especialmente hongos, como *Botrytis cinerea* ("Podredumbre del racimo") (Langcake y Price, 1976). Según el grado de inducción de la infección, su presencia, concentración, acción fungicida, y niveles serán muy variables.

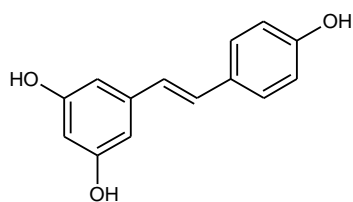


Figura 2. Estructura química del *trans*-resveratrol

3.2. Flavonoides

Dentro de los flavonoides, los grupos con mayor importancia en la uva y derivados son los que se muestran en la figura 3:

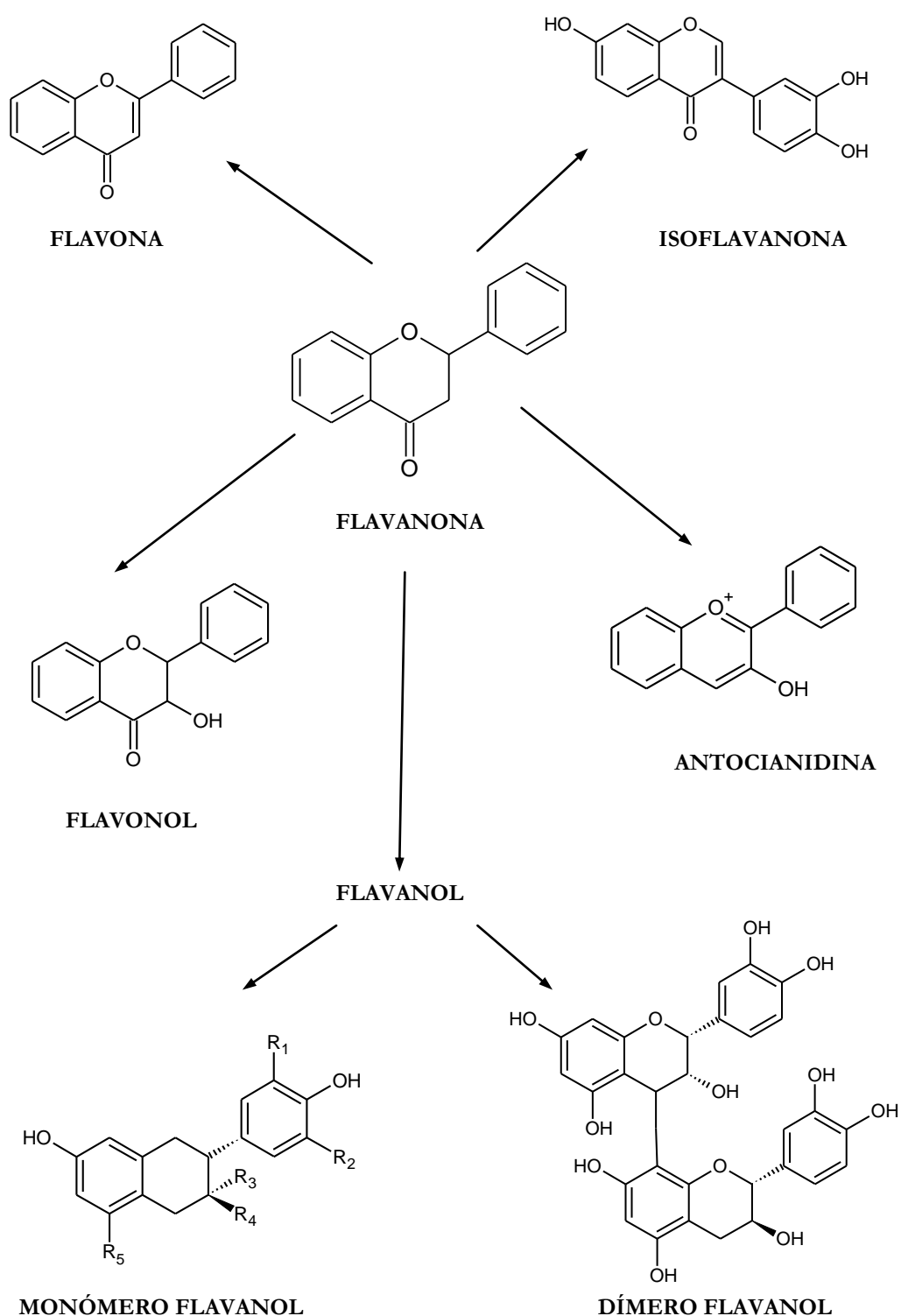


Figura 3. Estructura química y origen de los principales grupos de flavonoides presentes en la uva

3.2.1. Flavonoles

Estas son sustancias de color amarillo que principalmente se encuentran en los hollejos, tanto en forma de agliconas como de heterósidos. Entre las agliconas, las más importantes son: el kampferol (3, 5, 7, 4'-tetrahidroxiflavona), la miricetina (3, 5, 7, 3', 4', 5'- hexahidroxiflavona), la quercetina (3, 5, 7, 3', 4'-pentahidroxiflavona) y la isoramnetina (3, 5, 7, 4'-tetrahidroxi-3'- metoxiflavona), (Ribéreau-Gayon, 1964; Wulf y Nagel, 1980; Cheynier y Rigaud, 1986a).

En la uva, los flavonoles se encuentran básicamente como monoglicósidos y menos frecuentemente como diglicósidos. Las formas glicosiladas son las más abundantes pero se encuentran igualmente cantidades importantes de glucurónidos. Otras -osas encontradas en los flavonoles de la uva son la galactosa, xilosa y arabinosa. Se han observado grandes diferencias de composición entre las variedades tintas y blancas, cuyos contenidos en flavonoles varían de 10 a 100 mg/kg de bayas. Los derivados de quercetina son siempre predominantes; los de miricetina y 3-glucósido de isoramnetina parecen específicos de las cepas tintas (Cheynier y Rigaud, 1986b).

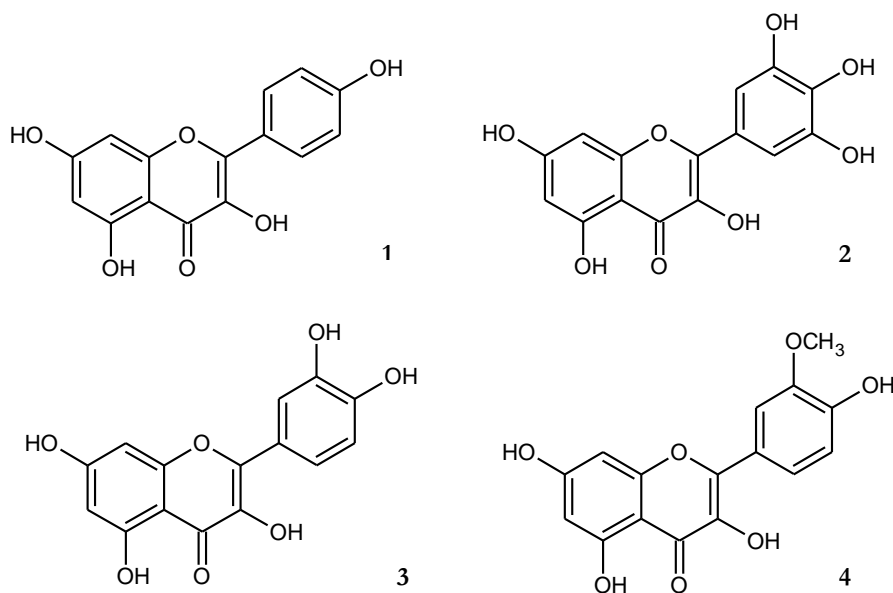


Figura 4. Estructura química de los flavonoles: kampferol (1), miricetina (2), quercetina (3), isoramnetina (4).

3.2.2. Flavanonoles

Los compuestos principales de esta familia (astilbina (3-ramnósido del dihidroquercetina) y engeletina (3-ramnósido del dihidrokaempferol)) han sido identificados principalmente en el hollejo de uva blanca, aunque se han encontrado también en pequeñas cantidades en hojas y raspón (Hmamouchi y col., 1996; Trousdale y Singleton., 1983). Se encuentran en concentraciones del orden de 9 mg/kg de materia fresca para la astilbina y 0.6 mg/kg para la engeletina.

3.2.3. Flavan-3-oles

Constituyen la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en la uva. Las más abundantes encontradas en la uva son: catequina, epicatequina, epicatequin galato y epigallocatequina (C, EC, ECG y EGC, respectivamente). Esta última se encuentra exclusivamente en los hollejos, mientras que la ECG se encuentra básicamente en las semillas. En la tabla 1 se recogen los flavan-3-oles monómeros presentes en la uva.

Tabla 1. Flavan-3-oles presentes en la uva

Flavan-3-oles	R1	R2	R3	R4	R5
Catequina	H	OH	OH	H	H
Epicatequina	H	OH	H	OH	H
Epicatequin galato	OH	H	O-galato	OH	H
Epigallocatequina	OH	OH	H	OH	H

Dentro de las PACs, las dímeras son las más sencillas y las más abundantes, en lo que se refiere a las uvas. Éstas, están formadas por la condensación de dos unidades de los monómeros C, EC o EGC (en el caso de los hollejos) y C, EC o ECG (en el caso de las semillas) unidas por enlace interflavánico de tipo B, C4-C6 o C4-C8, lo que da origen a los dímeros de tipo B. En la tabla 2 se muestran los posibles dímeros de

procianidinas no galoiladas y en la tabla 3 los 10 posibles dímeros de prodelfinidinas no galoiladas.

Tabla 2. Principales dímeros de procianidinas no galoiladas

Tipo	Subunidad superior	Subunidad inferior	Unión interflavánica
B1	(-)-epicatequina	(+)-catequina	C4 → C8
B2	(-)-epicatequina	(-)-epicatequina	C4 → C8
B3	(+)-catequina	(+)-catequina	C4 → C8
B4	(+)-catequina	(-)-epicatequina	C4 → C8
B5	(-)-epicatequina	(-)-epicatequina	C4 → C6
B6	(+)-catequina	(+)-catequina	C4 → C6
B7	(-)-epicatequina	(+)-catequina	C4 → C6
B8	(+)-catequina	(-)-epicatequina	C4 → C6

Tabla 3. Principales dímeros de prodelfinidinas no galoiladas

Tipo	Subunidad superior	Subunidad inferior	Unión interflavánica
D1	(-)-epicatequina	(-)-epigallocatequina	C4 → C8
D2	(-)-epigallocatequina	(-)-epicatequina	C4 → C8
D3	(-)-epigallocatequina	(-)-epigallocatequina	C4 → C8
D4	(+)-catequina	(-)-epigallocatequina	C4 → C8
D5	(-)-epigallocatequina	(+)-catequina	C4 → C8
D6	(-)-epicatequina	(-)-epigallocatequina	C4 → C6
D7	(-)-epigallocatequina	(-)-epicatequina	C4 → C6
D8	(-)-epigallocatequina	(-)-epigallocatequina	C4 → C6
D9	(+)-catequina	(-)-epigallocatequina	C4 → C6
D10	(-)-epigallocatequina	(+)-catequina	C4 → C6

La mayor parte de dímeros y trímeros de procianidinas identificados en la uva se unen mediante enlaces tipo B. En los hollejos predomina la procianidina B1, mientras que en las semillas encontraremos las procianidinas B3, B4, y B2, siendo esta última la más abundante (González-Manzano y col., 2004).

Además de estos dímeros, se han identificado algunas procianidinas y prodelfinidinas de mayor grado de polimerización, que van desde dímeros a pentámeros. En los últimos años, debido al avance en diferentes metodologías como la degradación química en presencia de nucleófilos, generalmente floroglucinol o bencilmercaptano y espectroscopía de masas (ESI o MALDI-TOF) se ha podido comprobar que en los hollejos de uva los polímeros de procianidinas pueden llegar hasta 80 unidades elementales (Sánchez Álvarez, 2000).

3.2.4. Antocianos

Los antocianos son compuestos solubles en agua, responsables del color rojo de las uvas tintas (que puede variar desde tonalidades rojizas hasta azuladas) y de los vinos tintos y rosados, encontrándolos, principalmente, en los hollejos de las uvas y en algunos casos, como el de las uvas tintoreras, en la pulpa.

Del número y la posición de los grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃) deriva la existencia de 5 agliconas en las uvas tintas: cianidina y delfinidina, que presentan sólo grupos hidroxilo, y malvidina, petunidina y peonidina, que presentan también grupos metoxilo (Usseglio-Tomasset, 1998; Rivas-Gonzalo, 2003).

Tabla 4. Principales antocianidinas encontradas en las uvas

Antocianidinas	R1	R2
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Petunidina	OCH ₃	OH
Peonidina	OCH ₃	H

En uvas *Vitis vinífera*, los antocianos existen exclusivamente en formas glicosiladas en C3. El azúcar que se encuentra con mayor frecuencia es la glucosa, aunque en algunas variedades se han detectado también ramnosa, galactosa y arabinosa. Estos azúcares se encuentran en muchas ocasiones acilados con los ácidos ferúlico, p-cumárico o cafeico (Harbone, 1986; Baublis y col., 1994).

La composición determina los efectos sinérgicos observados tanto *in vitro* (Cirico y Omaye, 2006) como *in vivo* (Pignatelli y col., 2006). Este efecto abre la posibilidad de aumentar la actividad biológica de la fracción fenólica del vino mediante suplementación con polifenoles procedentes de la misma uva o de otras fuentes.

4. FENOLES PROCEDENTES DEL LÚPULO

En el último siglo, e incluso en los años más recientes los investigadores han mostrado un creciente interés en el *Humulus lupulus* y sus componentes por sus actividades biológicas (Zanoli y Zavatti, 2008).

La planta del lúpulo es bien conocida como la materia prima en la industria cervecera. Las inflorescencias femeninas (lúpulo), ricas en compuestos fenólicos y acilfloroglúcidos son ampliamente utilizadas para conservar la cerveza y darle ese aroma y sabor característico. Además, el lúpulo se ha utilizado para fines medicinales, concretamente, se recomendaban preparaciones de lúpulo para el tratamiento de desórdenes del sueño, como relajante suave y para la activación de funciones gástricas.

Desde la segunda mitad del siglo XX, se llevaron a cabo varios estudios relativos a la composición de las inflorescencias y otras partes de la planta, llevando al aislamiento e identificación de compuestos farmacológicamente relevantes como flavanonas, chalconas preniladas o derivados del floroglucinol (Zanoli y Zavatti, 2008).

La cerveza aporta a la dieta polifenoles con los mismos efectos antioxidantes y protectores de enfermedades cardiovasculares que se han descrito ya en el vino; estos compuestos provienen fundamentalmente del lúpulo añadido a la cerveza para concederle su característico sabor amargo.

4.1. Flavonoides

El lúpulo contiene flavonoides con efecto positivo potencial en la salud humana, debido a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas y antiinflamatorias (Stevens y Page, 2004; Česlová col., 2009).

Varios estudios se han centrado en los prenilflavonoides como compuestos potenciales en la protección del cáncer (Vanhoeacker y col., 2001; Zhao y col., 2005a). Menos atención se ha prestado a otros compuestos fenólicos antioxidantes, como flavonoles y ácidos fenólicos, y apenas existen datos en la literatura sobre su contenido en el lúpulo: el lúpulo es rico en **flavonoles** (kaemferol, quercetina, quercitrina, rutina), **flavanoles** (catequin galato, epicatequin galato) (Sägesser y Deinzer, 1996; Gorissen y col., 1968), y **taninos condensados** (Stevens y Page, 2004).

4.1.1. Chalconas y flavanonas

Los flavonoides presentes en el lúpulo, fundamentalmente son prenilados (la prenilación es la adición de moléculas hidrofóbicas a un flavonoide) (Figura 5) lo que les confiere una mayor apolaridad en comparación con el resto de flavonoides, dando lugar a un incremento de su afinidad a las membranas celulares (Barron y col., 1996).

El prenilflavonoide más abundante es el xanthohumol (XN), cuya estructura química corresponde a una chalcona prenilada (Figura 6) y según Stevens y col. (2000) se encuentra presente en los conos del lúpulo en concentraciones del orden de 0.01-0.5 % en peso fresco.

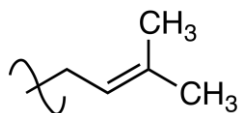


Figura 5. Grupo funcional prenilo

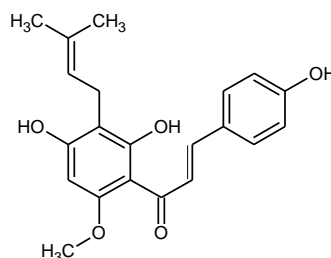


Figura 6. Estructura química del Xanthohumol (XN)

Según Stevens y Page (2004) el XN es el fitoquímico mejor estudiado del lúpulo con actividad quimiopreventiva de amplio espectro, por ser capaz de inhibir la activación del metabolismo de procarcinógenos, inducir la activación de enzimas detoxificantes de carcinógenos y ralentizar el crecimiento de tumores en estadios tempranos. Sumada a esta capacidad, dicha prenilchalcona es, junto con el desmetilxanthohumol, el prenilflavonoide del lúpulo que presenta mayor capacidad antioxidante.

El XN puede isomerizarse, en medio acuoso y tras un tratamiento de calor o de incremento de pH, originando una prenilflavanona denominada isoxanthohumol (IX) (Stevens y col., 1999b; Chadwick y col., 2006), la cual, gracias a la actividad de la microbiota intestinal (Possemiers y col., 2006) o mediante monooxigenasas hepáticas (citocromos P450 del hígado) (Guo y col., 2006), sufrirá una desmetilación dando lugar a una mezcla racémica de (+/-) 8-prenilnaringenina (8-PN) (Figura 7). El IX, también presente de manera natural en el lúpulo, es de los tres prenilflavonoides mayoritarios, el que posee comparativamente una menor actividad biológica. Sin embargo, determinados estudios apuntan hacia un posible efecto antiinflamatorio, así como a la capacidad antiproliferativa de tumores humanos "*in vitro*" (Young-Chan y col., 2010; Jeong Ho y col., 2010). Por otro lado se reconoce el efecto inhibidor del isoxanthohumol sobre la síntesis de prostaglandinas E2 (PGE2) en fibroblastos, tal y como se indica en una patente (Green y col., 2004).

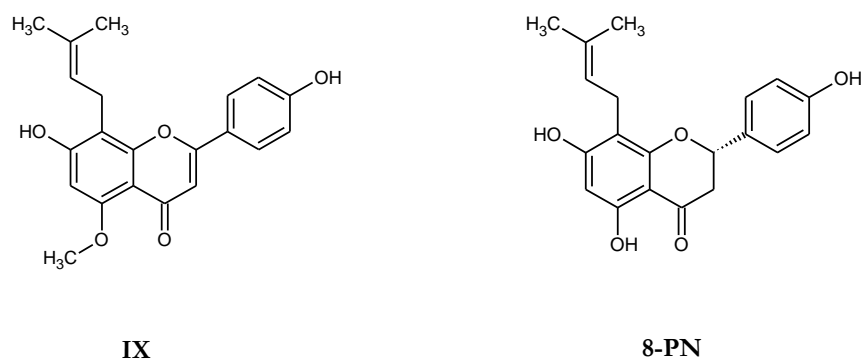


Figura 7. Estructuras químicas del Isoxanthohumol (IX) y de la 8-prenilnaringenina (8-PN)

La desmetilación de IX para dar 8-PN no es la única vía de síntesis de la 8-PN, existe otra vía más directa cuyo punto de partida es el desmetilxanthohumol (2',4,4',6'-tetrahidroxi-3'-prenilchalcona, DMX): mediante la ciclación del mismo se dará lugar a

una mezcla racémica de 8-PN y 6-PN. La mayoría de los flavonoides conocidos del lúpulo se pueden considerar derivados del DMX (Chadwick y col., 2006).

Por tanto, la 8-PN puede sintetizarse como único producto de la isomerización del IX, a partir de XN, o como parte de una mezcla racémica, junto con la 6-PN, partiendo de DMX. Según reflejan Zanolli y Zavatti (2008), de todos los flavonoides presentes en el lúpulo, es la 8-PN la que presenta una fuerte actividad estrogénica.

Los fitoestrógenos son compuestos químicos de origen vegetal que muestran efectos sugestivos de estrogenicidad, como la unión a receptores de estrógenos o la inducción de respuestas genéticas estrógeno-específicas para la producción de ciertos compuestos, entre otros (Marín y col., 2005). Estos compuestos son estructuralmente similares a los estrógenos endógenos de mamíferos y pueden actuar como antagonistas o agonistas dependiendo de su concentración en los tejidos de actuación.

La mayoría de los fitoestrógenos más conocidos, como la genisteína y la daidzeína (soja) se unen al receptor estrogénico beta (ER- β) mientras que la 8-PN del lúpulo, tiene una altísima afinidad y una alta selectividad por la forma alfa del receptor de estrógenos (ER- α), unas 100 veces mayor que genisteína (Shaefer y col., 2003). Esta característica no la poseen las isoflavonas (sustitutos del estradiol por excelencia), lo que convierte a la 8-PN en un compuesto muy atractivo desde el punto de vista farmacológico y funcional.

Los receptores estrogénicos ER- α y ER- β tienen considerable homología y su diferencia parece radicar únicamente en la capacidad de algunos tejidos, tales como los ovarios y el útero, para expresar ambos receptores, o frente a otros, que expresan preferentemente un receptor.

La actividad de los fitoestrógenos no sólo se reduce a mejorar la salud de las mujeres (actuando como el 17 β -estradiol, hormona femenina), también se ha demostrado que inhiben enfermedades cardiovasculares y reducen el riesgo de arteriosclerosis actuando como compuestos reductores del nivel de LDL, de colesterol y de triglicéridos en plasma, bien por los mecanismos anteriormente mencionados, debido a su estructura fenólica, o bien por otros mecanismos propios y específicos, dada su capacidad de actuación como hormonas (Marín y col., 2005).

Los efectos de los fitoestrógenos en las concentraciones plasmáticas lipídicas resultan de la acción estrógeno-receptor sobre la expresión hepática de genes de apoproteínas [ApoA, B, D y E, y Lp(a)]. Éstos incrementan las lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas antiaterogénicas, y reducen los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de la lipoproteína(a) (Lp(a)), ambas lipoproteínas aterogénicas. También los fitoestrogenos, al interferir con la actividad del factor de transcripción NF-kB, producen una drástica reducción en la expresión de genes inflamatorios.

Existen numerosos estudios que sugieren además que los fitoestrógenos influyen en la regulación del tono vascular. Las células endoteliales y musculares lisas de la pared vascular expresan ambos receptores ER- α y ER- β . En la vasculatura coronaria, los estrógenos revierten la vasoconstricción inducida por acetilcolina, vía estimulación de la sintetasa del óxido nítrico, a través de la activación de ER- α . Los estrógenos tienen acciones vasodilatadoras rápidas y efectos a largo plazo que inhiben las respuestas al daño vascular, previniendo la aterosclerosis. Los efectos rápidos probablemente ocurren sin cambios en la expresión genética, mientras que los efectos a largo plazo comprenden cambios en la expresión genética mediada por estos receptores (Mendelsohn y Karas, 1994).

Por tanto, debido a la capacidad funcional de este compuesto (8-PN) se ha planteado la hipótesis de añadir extractos de lúpulo concentrado en el compuesto de interés (8-PN o su precursor IX) a determinadas matrices alimenticias, elaborando así un nuevo alimento funcional.

5. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN PARA LA DESALCOHOLIZACIÓN DEL VINO

La eliminación parcial o total del contenido alcohólico en bebidas fermentadas como cervezas, vinos, sidras, etc. se basa en diversas técnicas que comprenden procesos de destilación con recuperación de los aromas, evaporación en columnas de platos con flujo descendente, como columnas de rectificación o columnas cónicas centrífugas (Spinning Cone Column) (SCC) (Narzib y col., 1988), procesos de separación por difusión a través de membranas semipermeables, como diálisis (Bandel y col., 1986), ósmosis inversa (OI) (Vradis y Flores, 1993), pervaporación (Daufin y col., 1998) o

extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Gamse y col., 1999; Brunner, 2005). La **destilación** en evaporadores o columnas con recuperación de los aromas es una de las primeras técnicas utilizadas en la desalcoholización de vinos. Son tecnologías que permiten el tratamiento de grandes volúmenes de vino con rendimientos de recuperación del alcohol muy altos, pero la transmisión directa del calor al vino produce graves alteraciones de las propiedades organolépticas del producto final (Pickering, 2000), ya que éstos contienen un gran número de sustancias cuya estabilidad química se puede ver alterada. Este inconveniente, se ha superado llevando a cabo el proceso de evaporación en vacío y a bajas temperaturas (inferior a 40° C). Aún así, se siguen produciendo importantes pérdidas de aromas que pueden superar el 75% (Fischer, 1995). Los compuestos más afectados son los ésteres y los alcoholes, lo que se traduce en la pérdida del carácter frutal y floral de los vinos desalcoholizados.

La separación del alcohol mediante **SCC** se basa en el principio de separación en etapas de vapor por destilación a bajas temperaturas y vacío (Pickering, 2000). Este proceso se lleva a cabo en tres etapas: en un primer paso, el vino base pasa por la columna cónica centrífuga a temperatura baja, en la que la fracción aromática pasa a fase gaseosa por arrastre con nitrógeno. Posteriormente, el vino desaromatizado vuelve a pasar por la misma columna, pero a temperatura más alta, operación en la que se separa otra fracción volátil constituida principalmente por etanol. En el tercer paso, al vino desaromatizado y desalcoholizado se le reincorpora la fase aromática separada en la primera etapa. Independientemente de que el propio proceso sea relativamente simple, la tecnología por sí misma es bastante compleja y muy cara, pero es una de las técnicas más utilizadas después de la ósmosis inversa en desalcoholización de vinos, sobre todo blancos, ya que permite recuperar “*a posteriori*” la fracción aromática.

La desalcoholización de bebidas por medio de extracción con fluidos supercríticos (**SFE**) se fundamenta en el equilibrio termodinámico que se establece entre dos fases en contacto, es decir, la bebida alcohólica y el disolvente supercrítico (una sustancia en condiciones de temperatura y presión por encima de sus valores críticos). Por tanto, la extracción con fluidos supercríticos es una técnica de separación de sustancias disueltas o incluidas dentro de una matriz, basada fundamentalmente en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico (FSC) de modificar su poder disolvente.

El poder disolvente de los FSC puede ser elevado, dependiendo de las condiciones de presión y temperatura aplicadas que permiten la disolución selectiva de determinadas sustancias. Las sustancias seleccionadas se separan fácilmente del fluido supercrítico. La extracción se realiza sin cambios de fase, simplemente variando las condiciones de presión y/o temperatura de los FSC.

La Ósmosis Inversa (**OI**) se basa en la capacidad de las membranas semipermeables compactas (no porosas) para restringir selectivamente el paso de la mayoría de los constituyentes de cualquier solución acuosa, y dejar que el agua pase libremente a través de ellas. En la desalcoholización de bebidas alcohólicas fermentadas se utilizan membranas con un rechazo de NaCl del orden del 95-98 %, que operan a presiones de 40-50 bares y temperaturas relativamente bajas (10-20°C), y que además del agua dejan pasar también una parte del etanol. La eliminación del etanol se consigue mediante su desplazamiento con agua desmineralizada en un proceso de concentración/dilución continuo denominado diafiltración (Bui y col., 1986; Chinaud, y col., 1991; Gómez-Plaza, 1999; Pickering, 2000; Pródanov y col., 2004).

A continuación, se desarrollan con más extensión los aspectos relevantes de las dos tecnologías aplicadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral: la basada en membranas y la de fluidos supercríticos.

5.1. Desalcoholización de vino mediante Ósmosis Inversa

La primera patente en la aplicación de ósmosis inversa en bebidas alcohólicas la registró la compañía cervecera alemana Lowenbrau en 1975; reivindicaba procedimientos de desalcoholización de cerveza y vino (Meier, 1992). Otras aplicaciones de la ósmosis inversa en el vino incluyen la eliminación de color y aromas, concentración de mosto, estabilización del vino frente a la precipitación de tartratos y eliminación de ácidos volátiles de zumos de uva (Baldwin, 1998; Smith, 2002).

Actualmente, la OI es probablemente la técnica de fraccionamiento más utilizada en la industria. Se emplea básicamente para desalinizar agua o para concentrar disoluciones

(extractos) acuosas complejas como lactosueros, zumos, cervezas, vinos o productos sensibles al calor, ya que este tratamiento está exento de calentamiento.

En tratamientos de mezclas tan complejas como los vinos, además del agua y el etanol, las membranas pueden ser atravesadas parcialmente por otras moléculas muy pequeñas, como sales minerales, metanol, u otros compuestos aromáticos (alcoholes superiores, aldehídos, ésteres, etc.). Las pérdidas de aromas pueden alcanzar niveles en torno al 40 % (Fischer, 1995). Aunque en menor proporción, los compuestos más afectados son los mismos que los encontrados en la desalcoholización por destilación (los ésteres y los alcoholes).

Para disminuir estas pérdidas, actualmente en la desalcoholización de vinos por OI se acopla una segunda etapa de “perstracción”. Esta etapa consiste en conducir la bebida alcohólica sobre una membrana porosa de contacto, fuertemente hidrófoba, que por fenómenos de repulsión, impide que el agua pase a través de ella. Por la zona de permeado de la membrana, se hace pasar una segunda fase líquida de contacto, que también suele ser agua. En estas condiciones, el agua se rechaza y el etanol atraviesa la membrana por fenómenos mixtos de evaporación, permeación y extracción (“perstracción”) y pasa al disolvente de contacto (el agua), mientras la mayor parte del resto de los compuestos volátiles se repelen con el agua de rechazo. Esta disolución tratada, ya empobrecida en etanol, vuelve pasar por el contactor hasta que el contenido de alcohol se reduce al nivel deseado. Con este procedimiento mixto se pueden lograr mayores niveles de desalcoholización, y además reducir las pérdidas de compuestos aromáticos (Daufin y col., 1998).

En general, la OI, al igual que la destilación, desequilibra sustancialmente las características organolépticas de los vinos, por lo que la mayoría de ellos se suelen corregir, principalmente con azúcar en proporción de 3 a 5 % y/o anhídrido carbónico.

5.2. Desalcoholización de vino por extracción con fluidos supercríticos

Estudios previos sobre desalcoholización de bebidas mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE) abarcan el campo de la cerveza (Stein, 1993), sidra (Medina y

Martínez., 1997) y vino (Gamse y col., 1999). Estos trabajos recogen la posibilidad de reducir considerablemente el contenido de alcohol en bebidas fermentadas (hasta concentraciones menores a 0.5%) utilizando columnas rellenas en contracorriente y CO₂ como disolvente supercrítico (Brunner, 2005). El producto del fondo de la columna de extracción constituye el vino desalcoholizado; el extracto obtenido contiene, además de alcoholes, los compuestos responsables del aroma del vino. Una ventaja importante de la tecnología supercrítica, respecto de las demás técnicas discutidas, radica en la posibilidad de recuperar una fracción importante del aroma simplemente por despresurización parcial del extracto.

La desalcoholización de bebidas por medio de extracción con fluidos supercríticos se fundamenta en el equilibrio termodinámico que se establece entre las fases que se ponen en contacto, es decir, la bebida alcohólica y el solvente supercrítico (sustancia mantenida a temperatura y presión superiores a las que definen su correspondiente punto crítico (Dabrio y col., 2000)). El disolvente en condiciones supercríticas es un gas denso, mantiene propiedades de transporte similares a las de los gases, y posee a la vez un gran poder solvente por tener densidades típicas de los líquidos (Reglero, 2001).

Debido a estas propiedades físico-químicas la SFE presenta varias ventajas sobre otros métodos de extracción tradicionales (Anklam y col., 1998). Por su baja viscosidad y relativamente elevada difusividad, los fluidos supercríticos tienen mejores propiedades de transporte que los líquidos, pueden difundir fácilmente a través de materias sólidas, y por tanto, pueden dar mayores rendimientos de extracción (Herrero y col., 2006), ya que al fin y al cabo, la desalcoholización es una extracción de alcohol de una matriz, en este caso, el vino.

En la práctica, más del 90 % de todas las extracciones con fluidos supercríticos se lleva a cabo con CO₂; aparte de tener relativamente baja presión crítica (74 bar) y temperatura (32°C), el CO₂ es poco tóxico, no inflamable, asequible a una alta pureza y coste moderado y fácilmente eliminable del extracto. En estado supercrítico, el CO₂ tiene una polaridad comparable al pentano líquido, y es, por tanto, el más adecuado para compuestos lipofílicos.

5.2.1. Sistema de extracción

Según requisitos específicos, el diseño de un sistema de extracción con fluidos supercríticos puede ser relativamente sencillo o muy complejo: básicamente, suele consistir en una bomba para el disolvente, que reparte el fluido a través del sistema, una bomba para el modificador, si fuera necesario, una celda o columna de extracción (en función de si se trata de sólidos o líquidos, respectivamente) y uno o más separadores o celdas de fraccionamiento, donde se recoge el extracto y se despresuriza el disolvente. Además, la celda o columna de extracción y los separadores se regulan mediante un controlador independiente de presión y temperatura, de tal manera que los compuestos extraídos se pueden recuperar en distintas fracciones si la despresurización se lleva a cabo por pasos. Así, se pueden obtener diferentes compuestos de cada separador, dependiendo de su diferencia de solubilidad en el fluido supercrítico (Figura 8).

Adicionalmente, se podría instalar un sistema refrigerador, especialmente diseñado para atrapar la mayoría de los compuestos volátiles, actuando como sistema de reciclaje con objeto de reutilizar el fluido empleado.

En el caso de una extracción de muestra líquida, como es el vino, el fluido supercrítico (normalmente CO_2) se desplaza hacia arriba, mientras la muestra, introducida desde arriba o la mitad de la columna, se desplaza hacia abajo por gravedad.

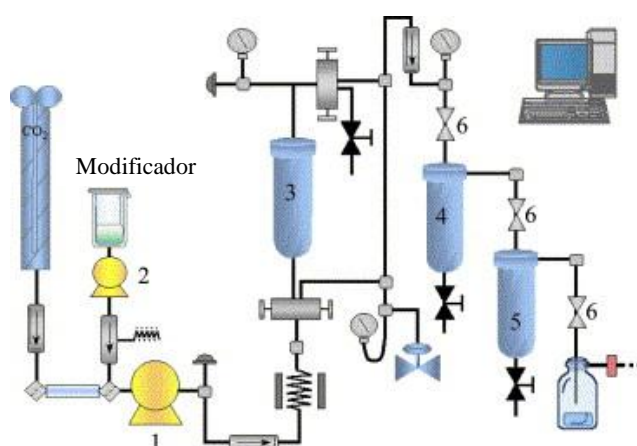


Figura 8. Diagrama de una planta piloto de extracción con fluidos supercríticos equipada con dos celdas de fraccionamiento: (1) bomba de CO_2 ; (2) modificador de la bomba; (3) celda de extracción para sólidos; (4) celda de fraccionamiento 1; (5) celda de fraccionamiento 2; (6) válvula (Herrero y col., 2006).

La presión y temperatura son dos parámetros muy importantes a tener en cuenta antes de comenzar una extracción con fluidos supercríticos. En cuanto al tiempo de extracción es importante maximizar el contacto entre el disolvente supercrítico y la muestra, para aumentar la eficacia de SFE.

6. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PREPARATIVA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MATERIAS VEGETALES SÓLIDAS

No existe un método universal para la extracción cuantitativa de compuestos fenólicos en tejidos vegetales, aunque se han propuesto muchas técnicas de extracción (Aubert y Poux, 1969; Bourzeix y col., 1975; Darné y Madero-Tamargo, 1979; Bourzeix y col., 1986; Tiarks y col., 1992). La extracción con disolventes, tanto orgánicos como mezclas acuosas, es el método más utilizado (Palma y col., 2001).

La extracción sólido-líquido a temperatura y presión ambiente requiere tiempos largos ya que es necesario alcanzar el equilibrio de los compuestos extraídos entre la disolución y el sustrato. Se añade disolvente sobre el mismo sustrato repetidas veces realizando varios ciclos de extracción, hasta su agotamiento. Además de un proceso largo, es caro, ya que se gasta mucho disolvente, que hay que recuperar. Sin embargo, a nivel industrial, el objetivo no es siempre agotar el sustrato, sino obtener la mayor riqueza de extracto, con la menor inversión económica posible (disolventes, energía, mano de obra, tiempo...).

En los últimos años se han desarrollado varios métodos de extracción como, extracciones asistidas por microondas o ultrasonidos; también se aplicaron, en la extracción de compuestos fenólicos de materias vegetales, técnicas basadas en el uso de fluidos comprimidos como agentes extractantes; entre ellos destacan la extracción con agua subcrítica, (SWE), la ya mencionada extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción con fluidos presurizados (PLE) o la extracción acelerada con disolventes (ASE).

La extracción con líquidos presurizados (**PLE**), también conocida bajo el nombre comercial de extracción acelerada con disolvente (**ASE**) es una técnica relativamente nueva, para la extracción de fitoquímicos bajo condiciones de elevada temperatura y

presión. En ASE, se aplica presión para permitir el uso de disolventes a temperaturas mayores que su punto de ebullición normal. El uso combinado de altas presiones (3-20 MPa) y temperaturas (40-200°C) proporciona procesos de extracción más rápidos y permite utilizar pequeñas cantidades de disolvente.

Elevadas temperaturas y presiones mejoran la solubilidad de los compuestos fenólicos y la transferencia de materia de la matriz al disolvente. Por tanto, los disolventes de la extracción, incluyendo el agua, que muestran una baja eficacia en la extracción de compuestos fenólicos a bajas temperaturas pueden ser mucho más eficaces a elevadas temperaturas (PLE). Cuando se usa agua como disolvente de la extracción en PLE la técnica es denominada extracción con agua subcrítica (**SWE**).

La extracción con agua subcrítica (SWE), es una tecnología que modifica las propiedades del agua, incrementando la temperatura hasta 374°C, y manteniendo la presión lo suficientemente alta como para mantener el agua en estado líquido, y mejorar así la capacidad de extracción. Se sabe que las propiedades físicas y químicas del agua, dentro de sistemas cerrados, pueden ser manipuladas controlando al mismo tiempo la presión y la temperatura, por las cuales, el agua permanece en estado líquido, incluso aunque su temperatura se vea claramente aumentada sobre su punto de ebullición atmosférico de 100°C. En esta condición, el agua se puede mantener en estado líquido hasta una temperatura de 374°C y una presión de 22.1 MPa (221 bar), después de la cual llega a ser agua supercrítica. Se puede considerar agua de baja polaridad la región desde presión atmosférica normal y temperatura ambiente hasta 22 MPa y 374°C.

La polaridad, viscosidad, tensión superficial y constante de disociación del agua subcrítica son significativamente menores en comparación con condiciones de presión y temperatura ambiente, de ese modo, altera significativamente sus propiedades hasta aproximarse a las de disolventes orgánicos. Así, un aumento de 25 a 200°C, por ejemplo, disminuiría su constante dieléctrica de 79 a 35, alcanzando valores similares al etanol (24) o metanol (33). Una presión de 5 MPa (50 bar) sería lo suficientemente alta como para mantener el agua en estado líquido durante este aumento de temperatura. Una presión de extracción mayor sería perjudicial para el proceso debido a un leve aumento en la constante dieléctrica y un considerable aumento en el coste del equipo.

A 25°C, la constante dieléctrica del agua aumenta de unos 79 a 93 cuando la presión aumenta de 10 a 600 MPa (100 a 6000 bares) (Haar y col., 1984). La polaridad del agua pura se podría comparar con las mezclas de metanol-agua o metanol-acetonitrilo, a 25°C. Como consecuencia, el agua subcrítica puede solubilizar fácilmente compuestos orgánicos, como algunos fenoles, que son normalmente insolubles en agua ambiental.

Puede estimarse que la SWE presenta ventajas sobre la extracción convencional sólido-líquido, como una mayor selectividad, limpieza, velocidad y reducción de costes tanto de materia prima como de energía. Los métodos basados en procesos de extracción secuencial con disolventes orgánicos son útiles para extracción y purificación de pequeñas cantidades de compuestos fenólicos, como es el caso de tareas de investigación; pero resulta complejo el escalado a volúmenes comerciales, debido a distintos problemas asociados: costes económicos, materia vegetal utilizada y extracción y recuperación segura de disolventes orgánicos procedentes de los extractos.

Además, los tipos y concentraciones de disolventes orgánicos deben ser seleccionados con cuidado para evitar cambios estructurales en los compuestos fenólicos durante la extracción, que pueden afectar negativamente a una o más de sus propiedades físicas, químicas o biológicas (Cacace y Mazza, 2007).

En los últimos años, el PLE se ha aplicado con éxito en la extracción de compuestos fenólicos de diferentes materias vegetales como semillas y hollejos de uva, manzanas, espinacas...

Es importante poner de manifiesto que las técnicas descritas son procedimientos "medioambientalmente sostenibles", ya que reducen el uso de disolventes orgánicos e incluso permiten realizar la extracción con disolventes no contaminantes y no tóxicos, como el agua o el CO₂ (Dai y Mumper, 2010).

7. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los extractos vegetales (vinos, orujos, lúpulo, etc.) son mezclas extremadamente complejas. Esta complejidad se debe, en buena parte, a la elevada cantidad de compuestos fenólicos (CF) que contienen y que generalmente se encuentran en cantidades muy pequeñas.

La diversidad de los CF de baja masa molecular (<1000 Da, que son los más estudiados) se debe a la inmensa variedad de estructuras como ácidos fenólicos y derivados, ácidos cinámicos y derivados, ácido elágico y derivados, estilbenos, flavan-3-oles, flavonoles, antocianos, flavanonas, etc.

Como es bien conocido, la diversidad de los polímeros de masas moleculares intermedias (1000-3000 Da), proantocianidinas oligómeras (OPACs), se debe a la estereoquímica del carbón C3 de las catequinas, que permite una primera variabilidad en unidades elementales como son la (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-galoepicatequina; la posibilidad de polimerización entre estas unidades elementales en cadenas de más de 20 unidades (hasta ahora se conocen las uniones C4-C8 y C4-C6 (unión de tipo B) pero no cabe descartar la existencia de otras uniones); la capacidad del carbono C3 de esterificarse con ácidos orgánicos, como el ácido gálico (puede que haya otros ácidos que pueden formar ésteres); la creación de una unión adicional por la formación de un puente etéreo, conocida como unión de tipo A, que puede formarse prioritariamente entre las unidades terminales del polímero; la presencia de otras estructuras que realmente no se conocen, pero de cuya existencia hay ciertas evidencias.

Es evidente que esta gran diversidad no permite la separación de todos los CF presentes en matrices vegetales en un único método para su análisis, por lo que éstos se suelen analizar por grupos de propiedades similares. De ahí que se distingan dos grandes grupos de métodos dedicados al análisis de CF:

Análisis global por familias: antocianos totales, polifenoles totales, proantocianidinas totales, etc. Estos métodos son relativamente económicos y rápidos, puesto que no es necesario ningún tedioso procedimiento de purificación para llevarlos a cabo, pero tienen el inconveniente de que son poco específicos y

reproducibles (Hagerman y Butler, 1989; Oszmianski y col., 1996; Waterhouse y col., 2000; Hümmer y Schreier, 2008).

Dentro de esta categoría de métodos, está el ensayo de Folin-Ciocalteu, ampliamente utilizado para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos. El método basado en la hidrólisis ácida de PACs en presencia de n-butanol-HCl (Porter y col., 1986) es el más utilizado en el análisis del conjunto de flavanoles, a pesar de las limitaciones del ensayo (Schofield y col., 2001), aunque también se emplea el ensayo con vainillina. Este último, ampliamente criticado por las grandes variaciones en los resultados obtenidos (Sun y col., 1998; Schofield y col., 2001) debido a la poca especificidad de la reacción para las PACs, puesto que ningún flavanol monomérico sustituido reacciona en el ensayo. El ensayo con 4-(dimetilamino)-cinamaldehído (DMACA) es otro de los métodos colorimétricos empleados para la estimación de proantocianidinas, descrito por Thies y Fischer (1971), basado en la formación de un cromóforo verde entre las catequinas y el DMACA, aunque el primer protocolo fue desarrollado por Mc Murrough y Mc Dowell (1978).

Análisis de fenoles individuales: La cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) es una de las técnicas más utilizadas hasta hora para el análisis de CF de baja masa molecular individuales. La separación sigue un orden decreciente de polaridades de los CF. Según el gradiente de polaridades de la fase móvil que se aplique se puede separar uno u otro grupo de compuestos. En todos los casos, el gran número de compuestos presentes en los extractos y en los vinos, no permite su total separación y análisis en una sola elución, independientemente de la fuerza del gradiente y del tiempo que se apliquen. Por esto, en la mayoría de los casos se hace una purificación previa para que se puedan analizar algunos de los CF de mayor interés. En los casos en que se realice inyección directa (sin purificación previa), normalmente muchos de los analitos se juntan en el frente, se quedan sin eluir al final o se superponen dentro en el cromatograma.

Otra técnica muy utilizada recientemente en análisis de compuestos fenólicos es la cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal (NP-HPLC), que permite la elución de los compuestos en orden creciente de masas moleculares, pero la separación está bastante limitada en lo que a capacidad de resolución se refiere. Sin embargo, el método permite obtener una visión global del perfil de masas moleculares

que contiene la muestra, además de la determinación de los distintos oligómeros por grupos de dímeros, trímeros, etc.

Para el análisis de flavan-3-oles de semillas de uva Rigaud y col. (1993) utilizaron una columna de sílice con la que consiguieron una separación relativamente aceptable de los monómeros y dímeros. Sin embargo, la separación de oligómeros de un grado de polimerización superior a tres fue imposible, dada la gran diversidad de formas galoiladas de estos compuestos. Hammerstone y col. (1999) utilizaron una columna de menor polaridad (Diol) con la que consiguieron la separación de oligómeros de procianidinas hasta decámeros. En este caso la separación fue mucho más satisfactoria, no tanto por la metodología utilizada sino porque se aplicó en el análisis de extracto de cacao, que desde el punto de vista químico es un sustrato mucho más sencillo, ya que está compuesto básicamente por procianidinas no galoiladas con uniones interflavánicas sólo de tipo C4-C8.

En general, la resolución cromatográfica es inferior a la fase reversa, dado que el solapamiento de los picos aumenta con la masa molecular, pero aún así, se ha empleado HPLC en fase normal en la cuantificación de procianidinas (Lazarus y col., 1999), procedentes de cacao, sidra y otros alimentos en los que los polímeros de proantocianidinas son menos complejos.

El mayor problema al que se enfrentan estos métodos es la necesidad de un paso previo de purificación de las muestras, debido a la complejidad y diversidad estructural de este tipo de compuestos. El número de isómeros de proantocianidinas aumenta exponencialmente a medida que se incrementa el grado de polimerización. Como consecuencia, la concentración de cada isómero será muy pequeña y la separación y cuantificación de proantocianidinas individuales muy difícil, comparada con la de otros compuestos fenólicos.

En el análisis de compuestos fenólicos individuales de baja masa molecular por métodos cromatográficos, el primer reto en la preparación de la muestra es la separación de las proantocianidinas oligómeras de compuestos interferentes como lípidos o clorofilas, así como la separación de compuestos fenólicos de muy alta y muy baja masa molecular. Monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros suponen sólo una pequeña proporción del total de flavanoles por lo que resulta imprescindible un paso previo de purificación de la muestra, previo al análisis cromatográfico. La presencia de

oligómeros de proantocianidinas de elevada masa molecular, además de otros compuestos fenólicos, resulta en una pobre resolución y desviación gradual de la línea base, lo cual dificulta la separación, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de baja masa molecular.

Si el método de purificación empleado es una extracción líquido-líquido se ha de tener en cuenta que las proantocianidinas son solubles en agua, independientemente de su masa molecular. Debido al doble carácter, hidrofílico e hidrofóbico, el desarrollo de procedimientos de purificación por extracción con disolventes es bastante complicado. La extracción con éter etílico ha sido ampliamente usada en la eliminación de lípidos (Fernández de Simon y col., 1996); así como el n-hexano o el iso-octano. En la extracción de proantocianidinas de un extracto acuoso, el disolvente más empleado es el acetato de etilo. Aunque la recuperación de proantocianidinas es mayor si se llevan a cabo extracciones sucesivas con pequeñas porciones del disolvente (Kirby y Wheeler, 1980), el acetato de etilo no resulta adecuado en el análisis cuantitativo, puesto que las proantocianidinas, en función de su estructura, presentan diferentes coeficientes de reparto (Lea, 1978; Lea y col., 1979) en este disolvente, quedando gran parte de las formas más polares en la fase acuosa.

Otros métodos de purificación como la extracción en fase sólida sobre columnas de C18 (octadecilsilano) (Oszmianski y col, 1988), de Sephadex LH-20 (Karchesy y Hemingway, 1986), Toyopearl TSK HW-40 (F) (Sun y col., 1999) o de poliamida (Ricardo da Silva y col., 1990) se han usado en la determinación de dímeros y trímeros de proantocianidinas. También se han fraccionado extractos de semillas de uva en compuestos monómeros, oligómeros y polímeros en columnas de gel de sílice modificado (Sun y col., 1998).

La columna más empleada para HPLC en fase reversa es la C18 y la elución es llevada a cabo por gradientes que emplean una mezcla de agua-acetonitrilo o agua-metanol como fase móvil. La mejora de la resolución de los picos, se consigue con gradientes lentos de acetonitrilo, empleando fases móviles aciduladas (Ricardo da Silva y col., 1990), con ácido fórmico, acético o trifluoroacético, entre otros.

La detección de compuestos fenólicos se lleva a cabo normalmente por PAD a 280 nm, para la mayoría de flavonoides, a 320 nm para los ácidos benzoicos, a 360 nm para los flavanoles y los estilbenos y a 520 nm para los antocianos. Para el análisis

específico de flavanoles es muy útil el detector de FL ($\lambda_{\text{ex}} = 280$; $\lambda_{\text{em}} = 320$). Sin embargo, para la identificación de CF de los que no se dispone de sustancias de referencia es imprescindible el acoplamiento al HPLC de un detector de espectroscopía de masas.

La espectrometría de masas ha sido aplicada en la determinación de masas moleculares de compuestos fenólicos procedentes de diversos materiales vegetales, usando FAB MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) (Ohnishi-Kameyama y col., 1997), ESI MS (electrospray ionization mass spectrometry) (Cheynier y col., 1997; Guyot y col. 1997; Hammerstone y col., 1999, ionización química a presión atmosférica (APCI) (De Pascual Teresa y Rivas Gonzalo, 2003) y MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization-Time of flight) (Yang y Chien., 2000; Krueger y col 2000; Vivas y col., 2004). En particular, ESI y MALDI-TOF se han utilizado en la caracterización del grado de polimerización y la estructura de las proantocianidinas. Aunque ambas técnicas son capaces de detectar iones moleculares intactos, ESI está más indicada en el análisis de biopolímeros monodispersos mientras que MALDI-TOF/MS lo está en la caracterización de oligómeros polidispersos (Hanton, 2001). La ventaja de la ionización de las moléculas por electrospray radica en que permite la detección de iones moleculares sin fragmentación de la molécula.

Mediante el análisis de extractos de semillas de uva por ESI MS encontraron varias procianidinas desde dímeros a pentámeros, como especies monocargadas ($[M-H]^-$) y de pentámeros a nonámeros como especies doblemente cargadas ($[M-2H]^{2-}$), con grado de galoilación hasta 3. Posteriormente un tridecámero y su monogalato fueron detectados en una fracción de procianidinas oligoméricas por MALDI-TOF MS (Pianet y col., 2002). Posteriormente, Hayasaka y col. (2003) detectaron varios iones simples, dobles y triplemente cargados en fracciones de extractos de semillas correspondientes a polímeros de procianidinas de hasta 28 subunidades y con un grado de galoilación comprendido entre 0 y 8, usando ESI-MS de alta resolución.

En los oligómeros de proantocianidinas, a medida que aumenta su masa molecular, aumenta también su tendencia a formar iones doblemente cargados. Esta fácil ruptura de los polímeros en modo ESI negativo, podría deberse a su tendencia a perder protones (Hayasaka y col., 2003). De esta forma, el C4 de un flavan-3-ol monomérico en las proantocianidinas es un electrófilo susceptible del ataque por iones nucleófilos

en la cámara de electrospray. La deprotonación del grupo hidroxilo en la posición 7 de la unidad monomérica, aumenta las propiedades electrófilas del C4 acelerando la ruptura del enlace interflavánico.

8. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPONENTES DEL VINO

8.1. Actividad antioxidante

En las últimas décadas se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares de enfermedades con base oxidativa, tales como el cáncer, la aterosclerosis o el Alzheimer. Por ello, desde hace años, los antioxidantes han adquirido un gran interés (Ames y col., 1995; Kaur y Kapoor, 2001).

El sistema fisiológico de defensa antioxidante está compuesto por estructuras de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E y C, β -caroteno, glutathion reducido, albúmina, compuestos fenólicos y metales de transición como Se, Cu y Zn, entre otros (Ramos y col., 2008).

Basándose en la química de las reacciones implicadas, los métodos más comunes para determinar la actividad antioxidante se pueden dividir en dos grupos principales (Huang y col., 2005; Tabart y col., 2009).

1. Medidas que se basan en la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), donde el antioxidante y un sustrato sonda compiten por los radicales libres. Por tanto, las determinaciones se basan, generalmente, en el descenso de señal de la molécula sonda.
2. Medidas que se basan en un sistema de transferencia de electrones (SET), dando lugar a una reacción redox en contacto con el oxidante, y se monitorizan por un cambio de color debido a la reducción de las moléculas oxidadas.

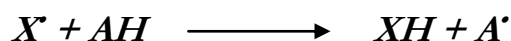
En la tabla 5 se recogen los ensayos de medida de capacidad antioxidante más empleados en la actualidad:

Tabla 5. Ensayos de capacidad antioxidante *in vitro*

Métodos SET	Métodos HAT	Otros Métodos
ABTS	ORAC	Resistencia de células rojas al estrés oxidativo
FRAP	HORAC	Actividad Catalasa y SOD
DPPH	TRAP	Capacidad de quelación de metales MCC
CUPRAC	Blanqueamiento de la crocina	
DMPD	IOU (absorción del oxígeno inhibido)	
FCR	Blanqueamiento del β -caroteno	
Inhibición de la oxidación de LDL		

8.1.1. Métodos HAT

Estos ensayos cuantifican la capacidad donadora de átomos de hidrógeno (Huang y col., 2005). Son los métodos más adecuados para determinar la capacidad de una sustancia de detener la cadena de propagación de radicales libres, fenómeno directamente relacionado con la capacidad de transferencia de átomos de hidrógeno, pero no siempre correlacionado con los potenciales de reducción (Sistemas SET). La metodología se basa en la siguiente reacción de transferencia de hidrógenos:



Entre los métodos HAT más empleados comúnmente se encuentran: ORAC, HORAC, TRAP, medida de blanqueamiento de la crocina, inhibición de la oxidación de LDL o blanqueamiento del β -caroteno. Este último es uno de los métodos que se ha empleado en el capítulo que determina la actividad antioxidante de los diferentes tipos de uva (Capítulo 1).

Ensayo del blanqueamiento del β -caroteno

Este método se basa en la formación de una emulsión acuosa de ácido linoleico y β -caroteno, donde se monitoriza la pérdida del β -caroteno durante la oxidación acoplada, a elevadas temperaturas (50°C), del ácido linoleico en presencia de oxígeno. De este modo, la consecuente formación del radical peroxilo, capaz de sustraer átomos de hidrógeno de la molécula del β -caroteno, da lugar al blanqueamiento del β -caroteno, siendo monitorizado mediante el descenso de la absorbancia a 470 nm. La actividad antioxidante de un compuesto se determina como la capacidad de minimizar la pérdida del β -caroteno durante la oxidación acoplada del ácido linoleico y el β -caroteno, siendo mayor la actividad antioxidante cuanto mayor es la inhibición del blanqueamiento (Baiano y col., 2009).

8.1.2. Métodos SET

Estos ensayos miden la capacidad reductora de un antioxidante (Huang y col., 2005), y se basan en la siguiente reacción de transferencia de electrones:



En los métodos SET uno de los más conocidos es el de Folin-Cicalteau (FCR), comúnmente empleado para la determinación de polifenoles totales. Además pertenecen a esta categoría los métodos: ABTS, FRAP, DMPD (N, N-dimethyl-p-phenylenediamine) y CUPRAC. En los últimos años se ha incorporado a este grupo el DPPH, que anteriormente formaba parte de los métodos HAT (Huang y col., 2005).

La sonda por sí misma es un oxidante que extrae un electrón del antioxidante, provocando un cambio de color. La intensidad del cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante, y la reacción finaliza cuando se estabiliza el cambio colorimétrico. Posteriormente se traza una recta de calibrado entre la concentración del antioxidante y el cambio de absorbancia registrado. La pendiente de la curva refleja la capacidad reductora del antioxidante, que se expresa en equivalentes de Trólox (TE) o de ácido gálico (GAE).

Ensayo del radical DPPH

El 2,2-difenilo-1-picrilhidracilo (DPPH) es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos disponibles, de carácter estable, y tiene un máximo de absorbancia en el rango UV-VIS a 517 nm (Huang y col., 2005).

El fundamento del método desarrollado por Brand-Williams y col. (1995) toma como base el cambio de color del radical DPPH (del púrpura al amarillo pálido), que debido a la existencia de un electrón desapareado en su estructura, se reduce en presencia de un compuesto antioxidante, cuantificándose la reacción (Ramos y col., 2008) por espectrofotometría UV-VIS a 517 nm.

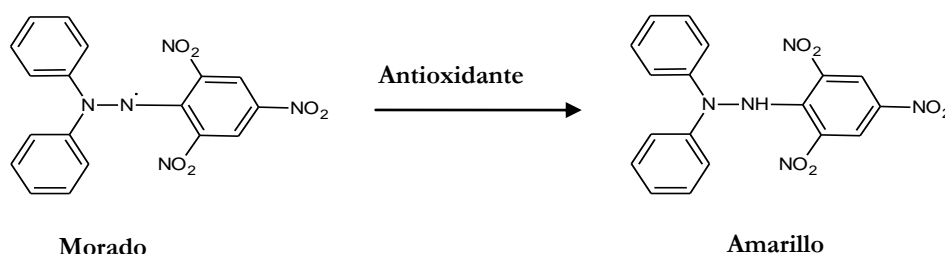


Figura 18. Esquema de la transición del radical DPPH a su forma reducida

8.2 Estrés oxidativo, inflamación y enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en los países desarrollados; se prevé que para 2030 esta cifra alcance los 23.6 millones de muertes al año (World-Health-Organization, 2011). El origen de este conjunto de enfermedades es multifactorial, siendo los factores de riesgo cardiovascular algunas de las causas más importantes. Algunos de estos factores son inmodificables, como el sexo y la edad, mientras que otros pueden ser modificados: consumo de tabaco, alta presión sanguínea, hipercolesterolemia y diabetes (Baena Díez y col., 2005). De entre los modificables, la hipercolesterolemia es especialmente susceptible de ser controlada mediante la alimentación.

8.2.1. Riesgo cardiovascular

En la actualidad, la hipótesis que señala a las LDL como las principales lipoproteínas responsables del proceso aterogénico está ampliamente consensuada (Scheffer y col., 2005; Kaliora y col., 2006; Mitra y col., 2011). Adicionalmente, existe una multitud de factores que pueden influir o desencadenar la aterogénesis, como la posible relación con *Chlamydia pneumoniae* (Gupta, 1999), el estrés (Black y Garbutt, 2002), la personalidad de cada individuo (Lovallo, 2005) y su percepción y actitud, el modo en que se ingieren los alimentos vía la regulación postprandial de la lipidemia (Robertson, 2006), e incluso la calidad del aire que se respira (Peters, 2005; Pickering, 2000). Además, parecen existir conexiones entre el proceso aterogénico y otras patologías.

La aterogénesis ha sido propuesta como un proceso eminentemente inflamatorio e inmunológico en el que la proteína C reactiva y las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un importante papel (Libby y Ridker., 2006). Se ha sugerido una íntima relación con la enfermedad de Alzheimer, en la que ésta surgiría como un evento secundario relacionado con la arteriosclerosis de los vasos intracraneales y extracraneales (Casserly y Topol, 2004), así como con los mecanismos subyacentes al inicio y desarrollo de la carcinogénesis (Li y Gao, 2005).

Estas conexiones indican la importancia de maximizar esfuerzos en aras de frenar el proceso aterogénico, cuyo beneficio afectará a la prevención de ECV y otras patologías.

La fisiopatología de la aterogénesis es un proceso complejo que pivota sobre varios eventos clave: disfunción endotelial, oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), adhesión y agregación plaquetaria, proliferación y migración de células de músculo liso y el proceso inflamatorio que involucra a monocitos y linfocitos T (Mann y col., 2004). De manera muy sucinta, la modificación de las LDL tiene lugar tanto en el plasma como en la capa íntima de la pared vascular, y afecta por igual a estructuras lipídicas y proteicas, siendo inducida por enzimas hidrolíticos, proteolíticos, ROS y otros mecanismos como la reacción de Fenton, sin olvidar las modificaciones vía formación de complejos lipoproteínas-proteoglicanos y complejos lipoproteínas-anticuerpos (Valko y col., 2007).

Las LDL oxidadas (ox-LDL) en la aterogénesis inducen la expresión de moléculas de adhesión y señales quimiotácticas en células endoteliales. Esta expresión, a su vez, induce la unión de los monocitos a las células endoteliales dentro de la pared arterial, su entrada en el sistema vascular, su diferenciación en macrófagos, y finalmente su transformación en células espumosas. Asimismo, estimulan a las células T CD4⁺ inmaduras mediante la unión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con el receptor T. Las células T CD4⁺ maduras secretan interleuquina (IL)-1, que incrementa la proliferación de células de músculo liso, IL-2 que activa a los monocitos e incrementa la proliferación de células T, e induce el interferón γ (IFN- γ) que favorece la expresión de MHC en las células endoteliales y del músculo liso, generando un proceso de retroalimentación (Kaliora, 2006).

Además, los macrófagos ya activados secretan una amplia variedad de citoquinas, tanto proinflamatorias, entre las que se encuentran IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , como antiinflamatorias, entre ellas IL-10 (Zhao y col., 2005b; Jung y col., 2008). Estas células producen así mismo enzimas proinflamatorias, como la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la ciclooxigenasa (COX), responsables del incremento en los niveles de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas como la E2 (PGE2) (Wu y Ng., 2007).

El control del binomio LDL/ox-LDL se ha realizado fundamentalmente mediante estrategias de aféresis que abarcan desde procedimientos quirúrgicos (bypass ileal) hasta el uso de fármacos (resinas secuestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) reductasa como las estatinas, dietas bajas en colesterol y grasas, ésteres de estanoles, niacina, derivados del ácido fibrótico, etc) (Thompson, y col., 2006).

Otras estrategias igualmente utilizadas se basan en la regulación metabólica del binomio LDL/ox-LDL mediante el uso de suplementos con ácidos grasos ω -3 (vía reducción de niveles de ácido araquidónico como precursor de eicosanoides proinflamatorios), uso de compuestos con actividad estrogénica (vía el aumento de HDL y la eliminación del colesterol), antioxidantes que prevengan la formación de ox-LDL, consumo de fibra insoluble, etc. A estas estrategias de uso clínico como recomendaciones dietéticas también ha contribuido la industria alimentaria mediante el suplemento de distintos alimentos con fibra y ácidos grasos ω -3. De entre estas

últimas herramientas de carácter nutricional, que no pueden ni deben ser comparadas con los instrumentos clínicos, hay que destacar una especialmente conocida: el consumo moderado de vino, habiéndose correlacionado positivamente, desde la formulación de la Paradoja Francesa, con una menor incidencia de ECV. Desde su enunciado varios estudios epidemiológicos, realizados en todo el mundo, incluyendo el proyecto MONICA (WHO, 1989) (MONItoring system for CARdiovascular disease), han mostrado una asociación entre el consumo de leve a moderado de bebidas alcohólicas y la reducción en el riesgo de padecer ECV, siendo una asociación en forma de U, es decir, el riesgo de ECV es menor en consumidores moderados de bebidas alcohólicas que en abstemios o fuertes consumidores (Mann y Folts, 2004).

Síndrome Metabólico

Existen diferentes definiciones, destacando la propuesta por la OMS (Alberti y col., 1999) y la federación internacional de diabetes (The International Diabetes Federation, IDF, 2005). Para definir el síndrome metabólico, los criterios de la Organización Mundial de la Salud incluyen la siguiente sintomatología: intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus y/o resistencia a la insulina, además de dos o más alteraciones entre las citadas a continuación:

- Presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg
- Dislipemia: triglicéridos (TG): ≥ 1.695 mmol/L y/o colesterol HDL (HDL-C) ≤ 0.9 mmol/L (en hombres), ≤ 1.0 mmol/L (en mujeres)
- Obesidad abdominal: relación cintura/cadera > 0.90 m (en hombres), > 0.85 m (en mujeres), y/o índice de masa corporal (IMC) > 30 kg/m²
- Microalbuminuria: excreción urinaria de albúmina ≥ 20 µg/min o relación albúmina/creatinina en orina ≥ 30 mg/g

La IDF define el síndrome metabólico como uno de los grupos de factores de riesgo de ataque al corazón más peligrosos: diabetes y prediabetes, obesidad abdominal, hipercolesterolemia e hipertensión arterial.

Dislipemias aterogénicas

Entre los riesgos ateroscleróticos se incluyen dislipemias aterogénicas, hipertensión, elevados niveles de glucosa plasmática, factores protrombóticos e inflamatorios. La asociación de factores de riesgo, como la obesidad o la resistencia a insulina, con la hiperinsulinemia, hiperglucemia y niveles elevados de adipoquinas, conduce a disfunciones endoteliales, desajustes en el perfil lipídico, hipertensión e inflamación vascular, todos ellos implicados en el desarrollo de la aterogénesis y el fallo cardiovascular.

Clínicamente la dislipemia aterogénica se caracteriza por elevados niveles de triglicéridos, incremento de LDL especialmente las partículas de menor tamaño y mayor densidad (sd-LDL) y descenso de los niveles de HDL. También se ha descrito un incremento de los niveles circulantes de ox-LDL asociado al síndrome metabólico; recientemente se ha identificado una relación directa entre la dislipemia aterogénica y la obesidad central, definida por el incremento en la circunferencia de cintura. Generalmente la dislipemia aterogénica precede a la manifestación clínica del síndrome metabólico (Jiamsripong y col., 2008).

Estrés oxidativo

La obesidad es el principal factor causante del síndrome metabólico. El mecanismo de acción está relacionado con un incremento en el estrés oxidativo de la grasa acumulada. Se ha demostrado una correlación directa entre los niveles de estrés oxidativo sistémico y los depósitos de grasa acumulada, tanto en humanos como en modelos murinos. Por lo tanto, la obesidad en sí misma se caracteriza por un incremento del estrés oxidativo a nivel de tejido adiposo. Este estrés oxidativo favorece la proliferación de preadipocitos y su posterior diferenciación, modulado por factores de transcripción sensibles a los radicales libres (Carriere A. y col., 2004). Por lo tanto, se produce un ciclo de retroalimentación donde el tejido adiposo incrementa el estrés oxidativo, que a su vez promueve la síntesis de triglicéridos y la diferenciación de adipocitos, por lo que se induce y amplifica la base de la obesidad.

Disfunción metabólica

En el proceso del desarrollo del síndrome metabólico se produce una desregulación en cuanto al uso de lípidos y carbohidratos como fuentes de energía. De esta forma tienen lugar situaciones anómalas que se asocian al proceso que desencadena la resistencia a insulina. En este proceso el músculo esquelético y el tejido adiposo juegan un papel clave en la utilización correcta de los triglicéridos circulantes o almacenados. En un correcto funcionamiento del tejido adiposo, el exceso de glucosa circulante es absorbido por los adipocitos estimulados por insulina. Los carbohidratos son metabolizados en triglicéridos para su almacenamiento. En caso de necesidad energética, los adipocitos liberan al torrente sanguíneo ácidos grasos libres, para su utilización como fuente de energía por parte del músculo esquelético y del hígado (Jiamsripong, y col., 2008).

En el caso del síndrome metabólico, se produce una liberación de los ácidos grasos al torrente sanguíneo, cuando no es necesaria, incrementando el riesgo aterogénico. En el control de la regulación metabólica del tejido adiposo, los receptores activados por proliferación de peroxisomas (PPAR) juegan un papel crucial: son factores de transcripción que se activan por la unión de ligandos específicos (naturales o sintéticos) y regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, formando así una conexión directa entre las señales extracelulares y la expresión de genes. Existen tres subtipos de PPAR, los PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , cuya expresión es específica de un tejido. La activación farmacológica de estos receptores con ligandos específicos ha permitido evidenciar su papel en la fisiología celular. Actualmente se utilizan en la clínica dos tipos de activadores, los fibratos específicos para los PPAR α con efecto hipolipemiante, y las tiazolidinedionas o glitazonas, agonistas de PPAR γ con acción hipoglucemiante, cuyos principales efectos radican en la activación de la oxidación y movilización de lípidos, y en la sensibilización de los tejidos periféricos a la acción de la insulina. Además de su efecto beneficioso sobre la homeostasis lipídica y de la glucosa, la activación de los PPAR confiere protección al miocardio en el desarrollo de enfermedades y participa en la modulación de la respuesta inflamatoria (Sugden y col., 2009).

8.2.2. Mediadores químicos implicados en el proceso inflamatorio

Entre los mediadores químicos que regulan la inflamación se encuentran:

- **Factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α):** inicialmente sintetizado por monocitos, es una potente citoquina proinflamatoria que juega un papel muy importante en la respuesta inmunitaria y en la inflamación. Esta citoquina activa el endotelio vascular incrementando la permeabilidad vascular y favoreciendo la entrada de inmunoglobulina (Ig) G. Así mismo tiene efectos sistémicos, que pueden ser perjudiciales, como fiebre, edema sistémico y shock. Se ha demostrado que es capaz de incrementar la respuesta antitumoral y que promueve la regresión tumoral (Cerami, 1993; Rothe y col., 1992; Tracey y col., 1993).
- **Citoquinas IL-1 β e IL-6:** activadoras del proceso inflamatorio. Al unirse IL-1 β al receptor de membrana IL tipo I, se desencadena una señal intracelular vía MAP Kinasa (MAPK), activándose los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, lo que provoca un incremento en la síntesis de genes proinflamatorios, incluida la amplificación autocrina de IL-1 β (Suzuki y col., 1989). En cuanto a la acción de IL-6, se conocen numerosos procesos en los que está implicada, incrementa la adhesividad de las células endoteliales al aumentar el número de receptores VCAM-1 y ICAM-1 en la superficie celular (Romano y col., 1997), induce la diferenciación de monocitos a macrófagos y células espumosas (Chomarat y col., 2000; Klouche y col., 2000), incrementa la producción de TNF- α en macrófagos activados con lipopolisacáridos (Cochran y Finch-Arietta, 1992) e induce la proliferación de células del músculo liso (Nabata y col., 1990).
- **IL-10:** actúa como interleuquina antiinflamatoria. Inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias, probablemente disminuyendo la expresión de NF- κ B (Bogdan y col., 1991; Schottelius y col., 1999). Inhibe la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y en su presencia se reduce la adhesión de los monocitos al endotelio debido a la disminución de la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales (Gazzinelli y col., 1992; Song y col., 1997).
- **Especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (ROS y NO):** mediadores químicos muy citotóxicos liberados durante el proceso inflamatorio (Posadas y col., 2000). El NO, sintetizado por la iNOS, puede modular la respuesta inflamatoria crónica. iNOS se expresa en respuesta al interferon- γ , los lipopolisacáridos y las

citoquinas proinflamatorias. Varios estudios han demostrado que durante la fase crónica de la inflamación hay un incremento en la actividad de la iNOS (Moncada y col., 1991; Yun y col., 1996). El NO regula la presión sanguínea, inhibiendo la adhesión leucocitaria, y por tanto la migración a través del endotelio, e inhibe la oxidación de las LDL. Sin embargo, el exceso de NO producido durante la inflamación por iNOS, interacciona con proteínas antioxidantes aumentando el estrés oxidativo y la inflamación (Radomski y col., 1987; Kubes y col., 1991; Zeiher y col., 1995).

- **Prostaglandina E2 (PGE2):** mediador que causa vasodilatación facilitando la progresión de la inflamación (Posadas y col. 2000). La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es la enzima encargada de su síntesis a partir de ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX: COX-1 y COX-2. COX-1 sintetiza de forma constitutiva PGE1 y COX-2 únicamente sintetiza PGE2 en respuesta a señales proinflamatorias como infecciones, estrés, citoquinas proinflamatorias o lipopolisacáridos (Morita, 2002).
- **NF- κ B:** factor de transcripción que regula la expresión de genes vinculados a la proliferación celular, respuesta inflamatoria y la adhesión celular, como iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β o IL-6 (Surh y col. 2001; Gonzales y Orlando, 2008). En forma inactiva NF- κ B se encuentra en el citoplasma unido a I κ B y para su activación se requiere de una señal extracelular que active a kinasas de I κ B (IKK), las cuales causan la fosforilación de I κ B y su posterior degradación en el proteasoma. De esta forma NF- κ B queda libre en el citosol y se puede traslocar al núcleo uniéndose al ADN para regular la expresión de los genes anteriormente señalados (Finco y Baldwin., 1995).

CAPÍTULO 1.
Materias primas: Uva.
Selección de variedades de
alta actividad antioxidante

OBJETIVO

El objetivo de esta primera parte de del trabajo de Tesis doctoral es valorar la conveniencia de la selección de la uva como materia prima para la elaboración de una bebida funcional a partir de vino, aplicando un método rápido de determinación de la actividad biológica potencial.

Como criterio de selección rápida se ha elegido la actividad antioxidante por estar ampliamente demostrada la base oxidativa de la mayoría de las enfermedades crónicas.

El trabajo se ha dirigido hacia los siguientes objetivos concretos:

- Determinar el procedimiento analítico más adecuado para la selección de la variedad de uva por su actividad antioxidante.
- Conocer las diferencias en la actividad antioxidante de una amplia selección de variedades de uva
- Confirmar la correlación existente entre la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos de los extractos de uva.

INTRODUCCIÓN

Cada vez se conoce más acerca del papel de los compuestos fenólicos como componentes de los alimentos de origen vegetal, en la prevención de varias enfermedades, cuyas bases están asociadas a los radicales libres (Auroma, 1994; Masaki y col., 1994; Halliwell, 1995).

Los compuestos fenólicos actúan fundamentalmente como antioxidantes mediante diversos mecanismos: como captadores de radicales libres, quelantes de metales catalizadores o desactivadores de oxígeno singlete (Madhavi y col., 1995; Shahidi y Naczk, 1995), por lo que el procesado de los vinos puede provocar un descenso en su capacidad antioxidante.

Entre los compuestos fenólicos de la uva y el vino se consideran como antioxidantes los ácidos benzoicos y cinámicos, algunos flavonoles, los antocianos y las procianidinas (Pratt y Hudson, 1990; Jovanovic y col., 1994; Jadhav y col., 1996; Saint-Cricq de Gaulejac y col., 1999). Así, compuestos como los flavan-3-oles en su forma aglicona y glucosilada, el estilbeno *trans*-resveratrol, los antocianos, y los ácidos fenólicos como el gálico, son importantes en uvas y vinos por su capacidad antioxidante (Manach y col., 2004; Iacopini y col., 2008; Peinado y col., 2009; Maier y col., 2009).

Los métodos empleados en este capítulo para la determinación de la actividad antioxidante de variedades de uva fueron el blanqueamiento del β -caroteno (método HAT) y el DPPH (método SET).

El ensayo del blanqueamiento del β -caroteno se caracteriza por minimizar la pérdida del β -caroteno durante la oxidación acoplada del ácido linoleico y el β -caroteno en una emulsión acuosa. (Baiano y col., 2009).

El ensayo del DPPH es una técnica simple, y ampliamente empleada para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos y muestras vínicas. Hay que prestar atención a la gran variabilidad de las distintas metodologías propuestas, lo que dificulta la comparación entre los resultados obtenidos por diferentes autores (Molyneux, 2004; Fernández-Pachón, 2004; Dani y col., 2007; Iacopini y col., 2008; Alén-Ruiz y col., 2009; Du y col., 2009; Tabart y col., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. UVAS

Se emplearon 32 variedades de uva procedentes de los viñedos experimentales de Bodegas Miguel Torres, S.A (Villafranca del Penedés, Barcelona). En la siguiente tabla se muestra el nombre de todas las variedades, con su correspondiente código identificativo:

Tabla 1. Variedades de uva blanca y tinta empleadas en el estudio de actividad antioxidante y sus códigos correspondientes.

VARIEDADES BLANCAS		VARIEDADES TINTAS	
<i>Nombre</i>	<i>Código</i>	<i>Nombre</i>	<i>Código</i>
Albarinyo	AL	Belsa	BE
Chardonnay	CH	Carinyena	CA
Chenin blanc	CB	Garnatxa negra	GN
Garnacha blanca	GB	Garro	GA
Garnacha blanca	GB-3,3,6	Mencia	ME
Macabeu	MC	Merlot sobremadurado	MT 3,3,2,3
Moscatel alexandria	MA	Pinot noir	PN
Parellada	PA	Pinot noir-guyot	PN-GUYOT
Riesling	RI	Pinot noir-royat	PN-ROYAT
Sauvignon blanc	SB	Syrah	SH
Viognier	VG	Tempranillo	TE
Xarel.lo	XA	Turiga nacional	TN
		Zinfandel	ZF
		Cabernet franc	CF
		Cinsault	CI
		Tanat	TA
		Variedad 4	VAR4
		Variedad 8	VAR8
		Bobal colección CB	BOBAL
		Variedad 1	VAR1

2. EXTRACTOS DE UVAS

A partir de cada una de las variedades de uva se obtuvieron dos tipos de extractos, uno acuoso y otro etanólico, ambos por duplicado. Además se tomaron tres alícuotas por cada uno de los extractos, analizándose por separado. Por tanto, se generaron 6 repeticiones para cada tipo de extracto.

2.1. Extractos acuosos

Así se denominó a los extractos obtenidos directamente del mosto que contienen las uvas, con el siguiente procedimiento:

Se pesaron 25 g de uva en un tubo Falcon de 50 mL y se trituraron en un Ultraturrax (T18 Basic, de IKA, Staufen, Alemania) hasta su homogeneización, a 15000 rpm, durante 20 s. A continuación se centrifugó en frío (5°C), a 4000 rpm durante 30 min. Se separó el sobrenadante obtenido por decantación y se midió el volumen. Se filtró con papel de filtro en un Falcon de 25 mL y después se pasó por un filtro de nylon de 0.45 μm (Teknokroma, Barcelona), almacenándose a -20°C para su posterior utilización.

2.2. Extractos etanólicos

Para la obtención de estos extractos se tuvo en cuenta el volumen de mosto obtenido en los extractos acuosos, de tal manera que al añadir el etanol, el contenido de éste en el extracto final fuera del 12 %. Se estableció el siguiente procedimiento:

Se pesaron 25 g de uva en un tubo Falcon de 50 mL, añadiendo a continuación el volumen correspondiente de etanol, siendo triturados con un Ultraturrax hasta su homogeneización a 15000 rpm, durante 20 s. Posteriormente se incubó en un baño de aire (Stuart S150, de Rhys Scientific, Reino Unido) protegido de la luz, a 45°C durante 2 h, con una agitación de 200 rpm, y se centrifugó en frío (5°C), a 4000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se separó por decantación y se midió el volumen de extracto. A continuación se pasó a un matraz aforado y se enrasó con etanol al 12 %. Al igual

que en los extractos acuosos se filtró con papel de filtro en un Falcon de 25 mL, seguido de un segundo filtro de nylon de 0.45 μm (Teknokroma, Barcelona), y se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Para la determinación de compuestos fenólicos totales se utilizó el Índice de Polifenoles Totales (IPT). Se realizó una evaluación del IPT por medida directa de la absorbancia de las muestras a 280 nm, para la cual se diluyó 1/100 para la medida de los extractos provenientes de uvas tintas y 1/50 para los de uvas blancas.

4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de uva se llevaron a cabo 2 ensayos diferentes: DPPH y Blanqueamiento del β -caroteno.

4.1. Medida de la actividad antioxidante por el método del DPPH

El método está basado en el protocolo descrito por Brand-Williams y col. (1995), que se fundamenta en la preparación de una disolución de DPPH de 23.5 mg/L en metanol. Se prepararon cuatro diluciones diferentes de cada extracto, de tal manera que se añadieron 25 μL de cada dilución a 0.975 mL de la solución de DPPH, dejándose reaccionar hasta la completa estabilización de la absorbancia a 517 nm. Posteriormente, y haciendo uso de una curva de calibrado para DPPH, se calculó el porcentaje de inhibición de la concentración inicial de DPPH con respecto a las diferentes diluciones llevadas a cabo. A continuación se comparó la curva de inhibición del extracto con la obtenida con un patrón de Trolox (análogo hidrosoluble a la vitamina E), expresándose el resultado de actividad antioxidante como valor TEAC (Trolox Equivalente Antioxidant Capacity) en mmol Trolox/L de mosto original. Se realizaron todos los ensayos por triplicado.

4.2. Medida de la Actividad Antioxidante por el método del blanqueamiento del β -caroteno

El método está basado en una versión modificada del protocolo propuesto por Gazzani y col. (1998). A continuación se describe brevemente el procedimiento utilizado: en un matraz redondo de 100 mL se pesaron 20 mg de ácido linoléico y 200 mg de Tween 20, añadiéndose a continuación 1.5 mL de β -caroteno (de Sigma-Aldrich. St Louis, EEUU) (0.1 mg/mL cloroformo). Se mezcló su contenido, se protegió de la luz con papel de aluminio y se eliminó el cloroformo mediante una corriente de nitrógeno. Posteriormente, se añadieron al matraz 50 mL de agua Milli-Q (Millipore. Billerica, Massachusetts, Estados Unidos), y se agitó hasta su completa homogeneización con ultrasonidos y vortex. A continuación se adicionaron en un tubo de ensayo 5 mL de la emulsión de β -caroteno y se añadieron 200 μ L de muestra o disolvente (agua o etanol al 12 %) (control). Se mezcló bien con el vortex, y se leyó su absorbancia a 470 nm mediante el uso de un espectrofotómetro. Tapado con papel de aluminio se dejó reaccionar durante 120 min. a 50°C en un baño orbital de aire con agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo se volvió a leer la absorbancia del tubo a 470 nm.

Para ajustar a cero el espectrofotómetro se llevó a cabo el mismo ensayo pero sustituyendo la disolución de β -caroteno con 1.5 mL de cloroformo y posteriormente añadiendo 200 μ L de disolvente a los 5 mL de emulsión. Asimismo, se llevó a cabo el blanco de las muestras con el fin de evaluar el color de las mismas, haciendo el mismo ensayo que con las muestras pero sin añadir β -caroteno. Por último, se hizo la medida del control que consistió en el mismo ensayo que para las muestras, pero añadiendo 200 μ L de disolvente en el que estuviera disuelta la muestra, a los 5 mL de emulsión de β -caroteno-linoléico-tween 20.

Los cálculos para llevar a cabo la medida de la actividad antioxidante (%) son los siguientes:

AA (%) = [(dr control – dr muestra)/dr control] x 100, donde:

dr control = \ln (Abs t=0 del control/Abs t=120 control)/120

dr muestra = \ln (Abs t=0 de la muestra/Abs t=120 muestra)/120

Para determinar el valor TEAC se utiliza la curva de inhibición tanto del extracto como del patrón de Trolox. Comparando los valores de concentración del patrón de Trolox que produce un 70% de inhibición (IC_{70}) con el de la muestra, se obtiene el valor TEAC, expresándose el resultado como mmol Trolox/L de extracto. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.0. Para la comparación de las diferencias de las medias de los distintos tipos de extractos se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de comparaciones múltiples de Duncan, a un nivel de significación de $p \leq 0.05$.

La correlación existente entre el contenido en compuestos fenólicos (IPT) y la actividad antioxidantes mediante los métodos de DPPH y blanqueamiento del β -caroteno se realizó mediante el análisis de Pearson a un nivel de significación de $p \leq 0.001$. Para ello se empleó el programa SigmaStat Statistical software (Windows Version 5.0 Systat Software Inc., Point Richmond, California, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DPPH

1.1. Uva blanca

Los resultados obtenidos en la medida de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de las 12 variedades de uva blanca, por el método del DPPH, expresados como valor TEAC (mmol Trolox/L extracto), se muestran en las figuras 1 y 2 y tabla 1 del Anexo del capítulo (donde también se recoge el análisis estadístico de las muestras).

El valor TEAC de los extractos acuosos varió entre 0.157 y 2.930 mmol Trolox/L (figura 1). Las variedades que mostraron una mayor capacidad antioxidante fueron Chenin blanc, y Garnacha blanca (código 3,3,6), junto con Viognier. El resto de las variedades analizadas mostraron actividades antioxidantes similares entre ellas, pero con valores mucho menores. De esta manera, según se deduce de los resultados obtenidos, Chenin blanc, así como Garnacha blanca (código 3,3,6) y Viognier son las variedades más adecuadas para la elaboración de un vino blanco con alta capacidad antioxidante.

Los extractos etanólicos siguen, en general, el mismo patrón que los acuosos (Figura 2), a excepción de las variedades Albariño y Riesling, que incrementaron notablemente su actividad. El valor TEAC de los extractos etanólicos varió entre 0.446 y 6.358 mmol Trolox/L. De esta manera, el extracto etanólico más activo resultó ser en esta ocasión el de Garnacha blanca (código 3,3,6), seguido de Chenin blanc, Riesling y Albariño. Otro extracto con una actividad interesante resultó ser el procedente de la variedad Viognier. Por otro lado, las variedades restantes mostraron una actividad antioxidante similar entre ellas, aunque mucho más bajas.

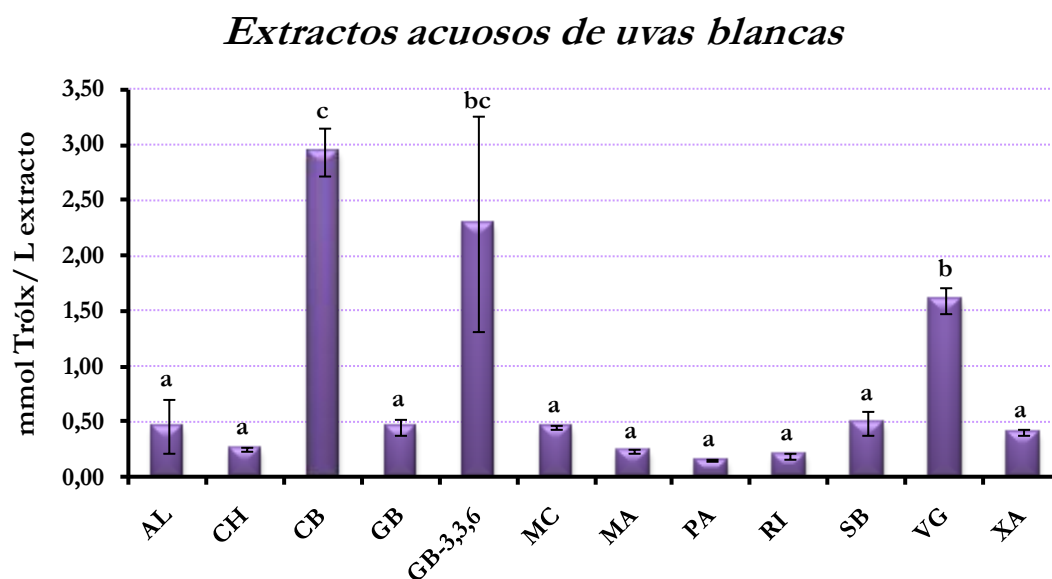


Figura 1. Valores TEAC de los extractos acuosos de 12 variedades de uva blanca. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

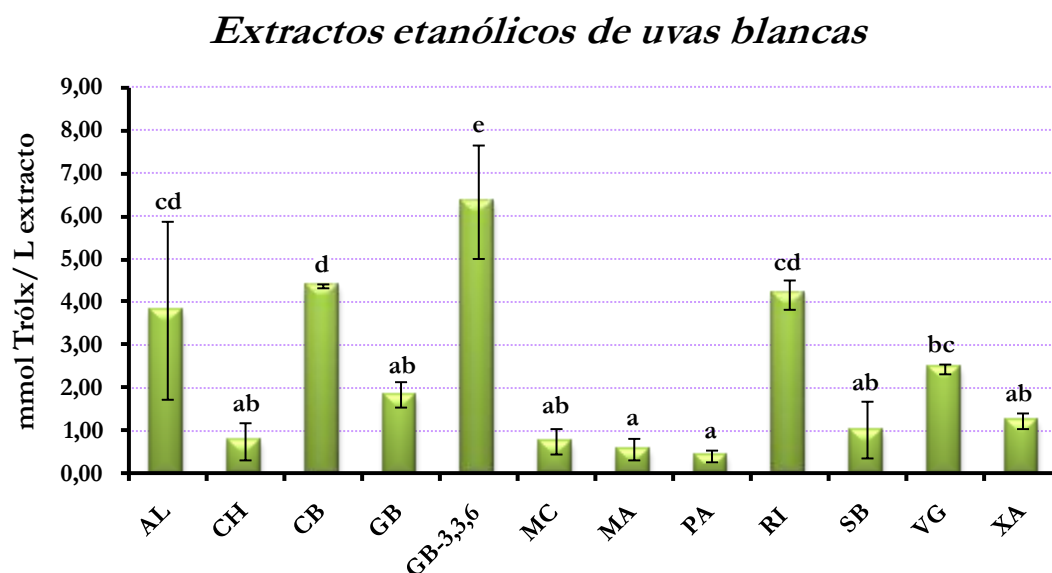


Figura 2. Valores TEAC de los extractos etanólicos de 12 variedades de uva blanca. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En la figura 3 se han agrupado los datos de las figuras 1 y 2 para su mejor comparación. Se observa que las actividades antioxidantes de los extractos etanólicos fueron superiores a las de los acuosos para todas las variedades excepto para Sauvignon blanc, Macabeo, Moscatel Alexandría y Chardonnay; sin embargo, no todas las variedades mostraron el mismo incremento. Cabe destacar variedades como Riesling, Garnacha blanca, Garnacha blanca (código 3,3,6) y Albariño, que mostraron aumentos notables en el valor TEAC, mientras que los extractos etanólicos obtenidos a partir de otras variedades sólo mostraron aumentos moderados.

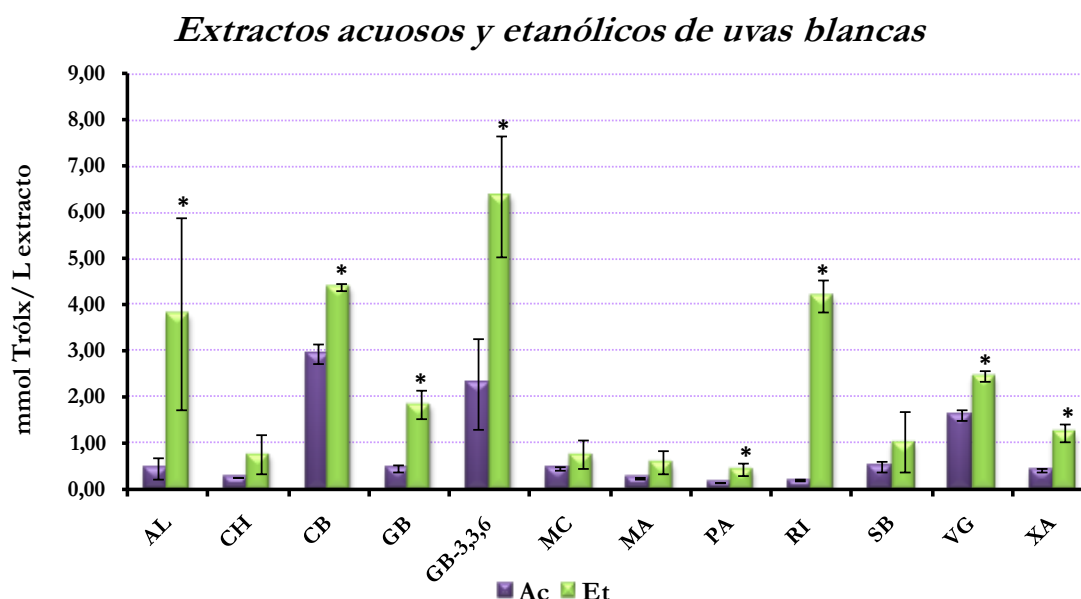


Figura 3. Valores TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de 12 variedades de uva blanca. (*) Diferencias significativas en los extractos etanólicos respecto a los acuosos mediante el análisis de Duncan ($p \leq 0,05$).

En general, los extractos acuosos presentaron valores TEAC similares a los descritos en la bibliografía para vinos blancos (Fernández-Pachón y col., 2004). En este sentido, los extractos acuosos obtenidos para Sauvignon blanc y Riesling mostraron valores similares a vinos monovarietales elaborados con estas variedades. No obstante, ciertas variedades, como Chenin blanc y Chardonnay, ofrecieron diferencias respecto a sus vinos monovarietales (De Beer y col., 2003; Staško y col., 2008).

1.2. Uva tinta

Los resultados obtenidos en la medida de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de las 20 variedades de uva tinta, por el método del DPPH, expresados como valor TEAC (mmol Trolox/L extracto), se muestran en las figuras 4 y 5 y tabla 2 del anexo de este capítulo (donde también se recoge el análisis estadístico de las muestras).

El valor TEAC de los extractos acuosos varió entre 0.836 y 13.588 mmol Trolox/L extracto, donde los valores más activos fueron los correspondientes a la Variedad 4, seguido de Mencía, Syrah y Belsa. Además, la variedad Tanat, junto a otras variedades, permitió obtener un extracto acuoso con actividad antioxidante importante. Por el contrario, el extracto obtenido a partir de la variedad Bobal resultó ser el menos activo

En cuanto a los extractos etanólicos los valores TEAC oscilaron entre 4.62 y 23.42 mmol Trolox/ L extracto. Al igual que ocurría con los extractos acuosos, la Variedad 4, Mencía y Belsa presentaron la mayor capacidad antioxidante, seguidas nuevamente de Tanat. El resto de variedades mostraron diferentes actividades antioxidantes, siendo la menor la correspondiente a la variedad Bobal. Las variedades más adecuadas para la elaboración de vinos con una elevada actividad antioxidante serían la Variedad 4 y Mencía.

Extractos acuosos de uvas tintas

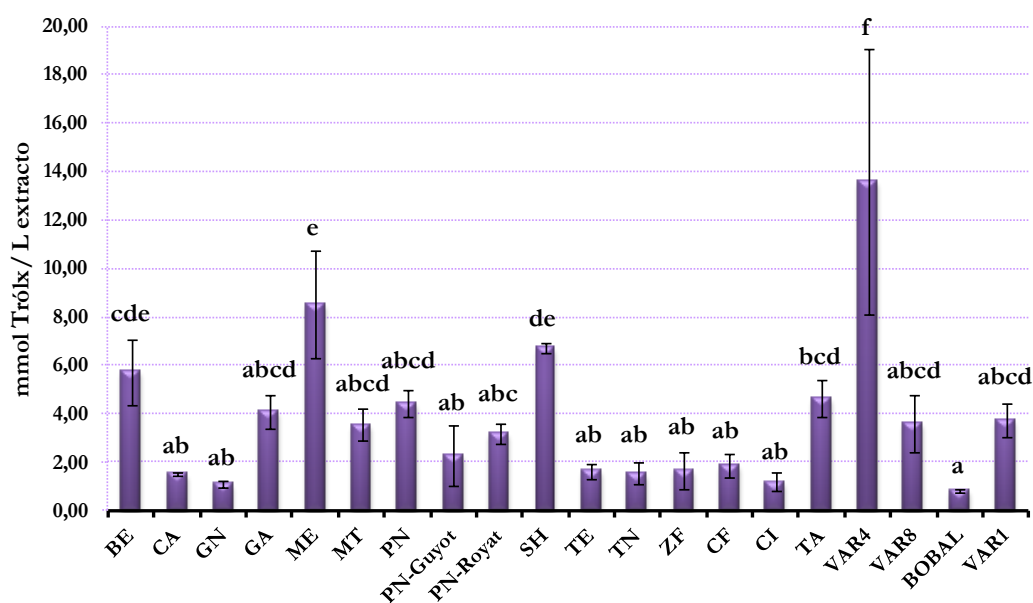


Figura 4. Valores TEAC de los extractos acuosos de 20 variedades de uva tinta. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Extractos etanólicos de uvas tintas

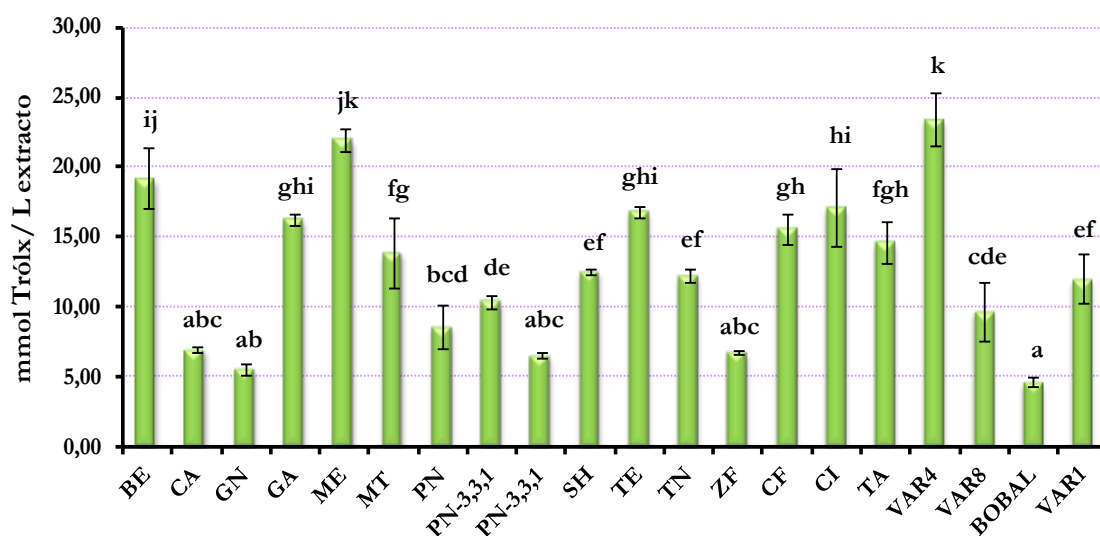


Figura 5. Valores TEAC de los extractos etanólicos de 20 variedades de uva tinta. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La vinificación en tintos conlleva una etapa fermentativa de maceración de los mostos con los hollejos y las pepitas. Así, la extracción etanólica mediante un proceso macerativo de las uvas tintas podría ser utilizada como referencia de las características esperables en un vino tinto elaborado con cada una de las variedades estudiadas.

En la figura 6 se reúnen todos los datos de las figuras 4 y 5 para su mejor comparación.

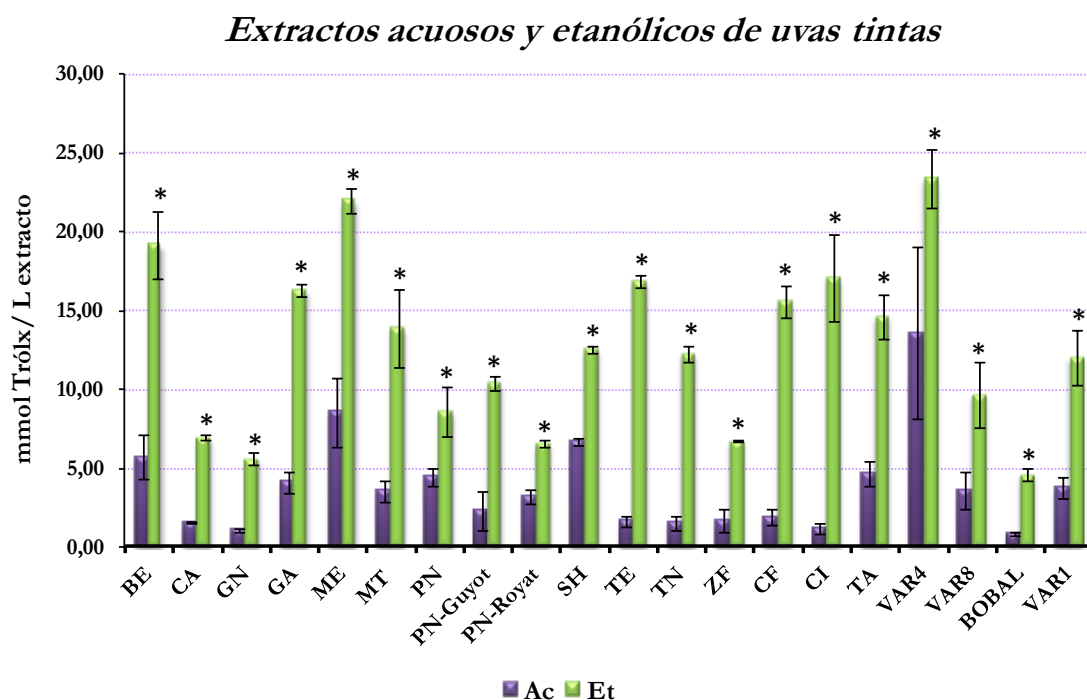


Figura 6. Valores TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de 20 variedades de uva tinta. (*) Diferencias significativas en los extractos etanólicos respecto a los acuosos mediante el análisis de Duncan ($p \leq 0,05$).

En general, los extractos acuosos presentaron actividades antioxidantes intermedias entre los vinos blancos y tintos, lo que se corresponde con la ausencia de un proceso macerativo del mosto con los hollejos y pepitas (principales fuentes de compuestos antioxidantes) (Landrault y col., 2001). En este sentido, la actividad antioxidante de los extractos acuosos se corresponde con los valores obtenidos por diversos autores (De Beer y col., 2003; Fernández-Pachón y col., 2004; Staško y col., 2008).

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos fue, para todas las variedades tintas, superior a la de los extractos acuosos. La maceración del orujo en un medio hidroalcohólico permite llevar a cabo una extracción de compuestos fenólicos con mayores rendimientos frente a extracciones acuosas (Pinelo y col., 2005). Este hecho se debe a que el etanol mejora la solubilidad de ciertos compuestos fenólicos, además de ser capaz de retirar la capa grasa que rodea y protege a las pepitas, produciendo así una extracción más efectiva de los compuestos fenólicos procedentes de las pepitas (Ivanova y col., 2009). Por tanto, es entendible que los extractos etanólicos posean un

mayor contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante que sus respectivos acuosos.

Como se comentó previamente, el proceso de maceración acelerada aplicado en este estudio permitió la obtención de unos extractos hidroalcohólicos semejantes a los vinos tintos. En general, los valores de actividad antioxidante de los extractos etanólicos coinciden con los esperados para vinos tintos (Fernández-Pachón y col., 2004). En este sentido, De Beer y col. (2003) determinaron, para vinos monovarietales de Merlot y Syrah, valores similares a los obtenidos para los extractos etanólicos de estas variedades.

2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DEL BLANQUEAMIENTO DEL B-CAROTENO

El blanqueamiento del β -caroteno es un método ampliamente utilizado, sin embargo, las diferentes condiciones experimentales, así como las distintas formas de expresión de los datos dificultan la comparación entre los resultados. Estos datos suelen expresarse como porcentaje de actividad antioxidante (Gazzani y col., 1998), aunque otros autores lo expresan como coeficiente de actividad antioxidante (Baiano y col., 2009).

En este estudio los datos se expresaron como valor TEAC (mmol Trolox/L extracto), permitiendo así establecer una comparativa cuantitativa de actividad antioxidante entre los diferentes extractos, así como una correlación cuantitativa entre el contenido de compuestos fenólicos de cada extracto y su actividad.

2.1. Uva blanca

Como puede observarse en la figura 7 los extractos acuosos de las 12 variedades de uva blanca estudiadas mostraron unos valores de actividad antioxidante que oscilaron entre 0.13 y 0.97 mmol Trolox/L extracto. El extracto acuoso que mostró la mayor actividad antioxidante resultó ser el obtenido a partir de la variedad Garnacha blanca,

seguido de Chardonnay, y posteriormente Viognier. Por el contrario, Garnacha blanca (3, 3, 6), destacó por su baja actividad antioxidante.

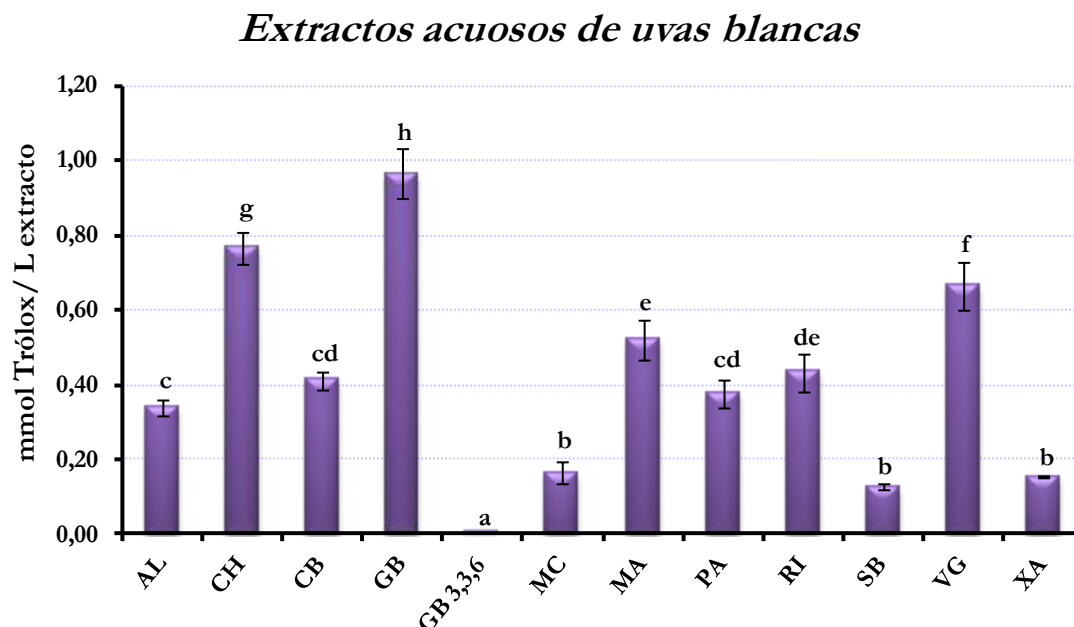


Figura 7. Valores TEAC de los extractos acuosos de 12 variedades de uva blanca. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Los extractos etanólicos no siguieron el mismo patrón de actividad antioxidante que los acuosos, como muestra la figura 8, con valores entre 0.30 y 51.6 mmol Trolox/L extracto. El extracto de la variedad Garnacha blanca (código 3,3,6), presentó una destacable actividad antioxidante. El extracto de Viognier, aunque en menor medida que el anterior, también destacó por una elevada actividad antioxidante. El resto de variedades ofrecieron valores inferiores, especialmente Macabeo, Sauvignon blanc, Moscatel Alexandria y Xarel.lo.

Extractos etanólicos de uvas blancas

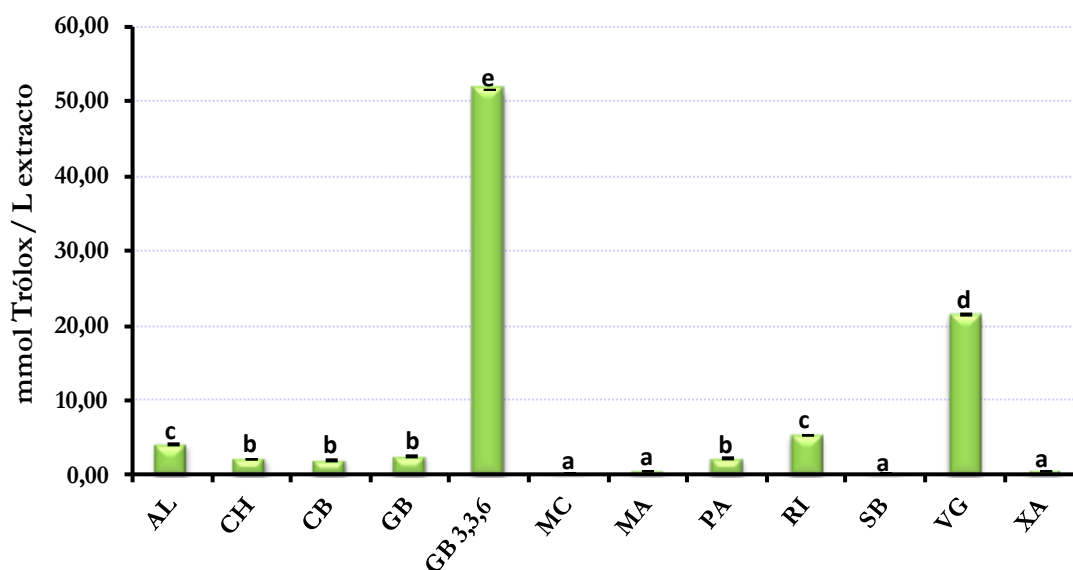


Figura 8. Valores TEAC de los extractos etanólicos de 12 variedades de uva blanca. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En la figura 9 se presentan los datos de actividad antioxidante de los extractos tanto etanólicos como acuosos, éstos últimos incrementados 10 veces para facilitar su observación. En general, los extractos etanólicos de las diferentes variedades de uva blanca, mostraron una mayor actividad antioxidante que sus respectivos acuosos. Únicamente el extracto etanólico de la variedad Moscatel Alexandría resultó similar a su respectivo extracto acuoso.

El incremento de la actividad antioxidante en los extractos etanólicos resultó moderado respecto de los acuosos, a excepción de los obtenidos de las variedades Garnacha blanca (código 3,3,6) y Viognier, que mostraron los incrementos más importantes.

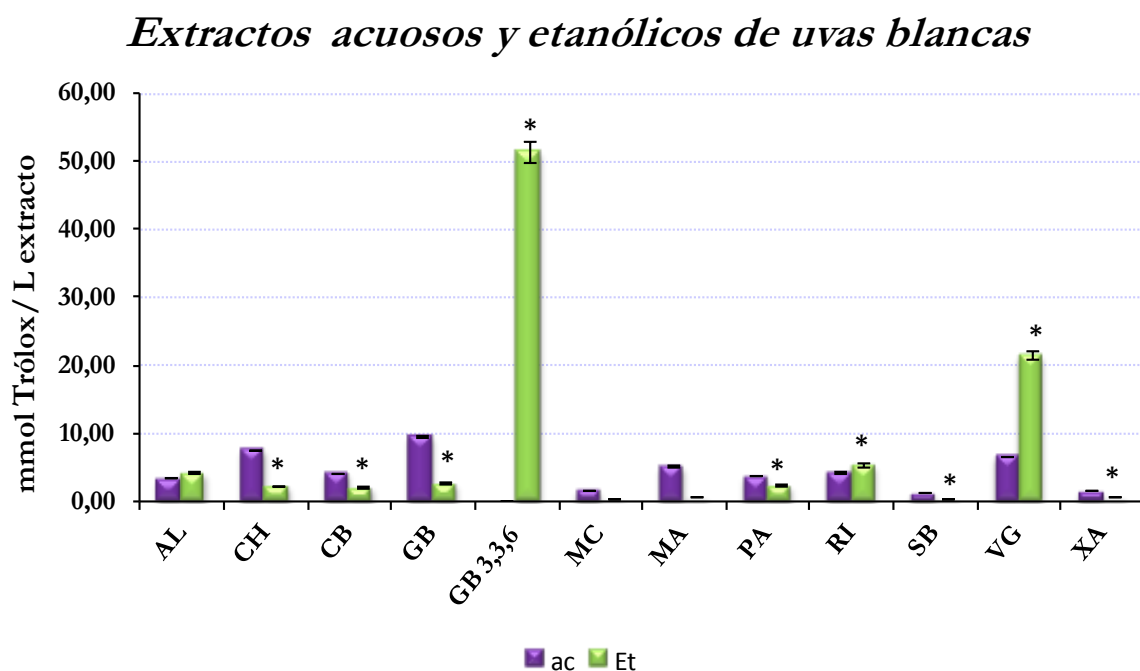


Figura 9. Valores TEAC de los extractos acuosos (x10) y etanólicos de 12 variedades de uva blanca. (*) Diferencias significativas en los extractos etanólicos respecto a los acuosos mediante el análisis de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.2. Uva tinta

Los valores de la actividad antioxidante de los extractos acuosos de las variedades tintas fluctuaron entre 0.38 y 20.26 mmol Trolox/L extracto. Sin embargo, el perfil antioxidante presentó valores similares entre ellos, exceptuando los procedentes de la Variedad 4, Syrah y Merlot que presentaron valores superiores, y el de la variedad Bobal, que resultó especialmente bajo (Figura 10).

Extractos acuosos de uvas tintas

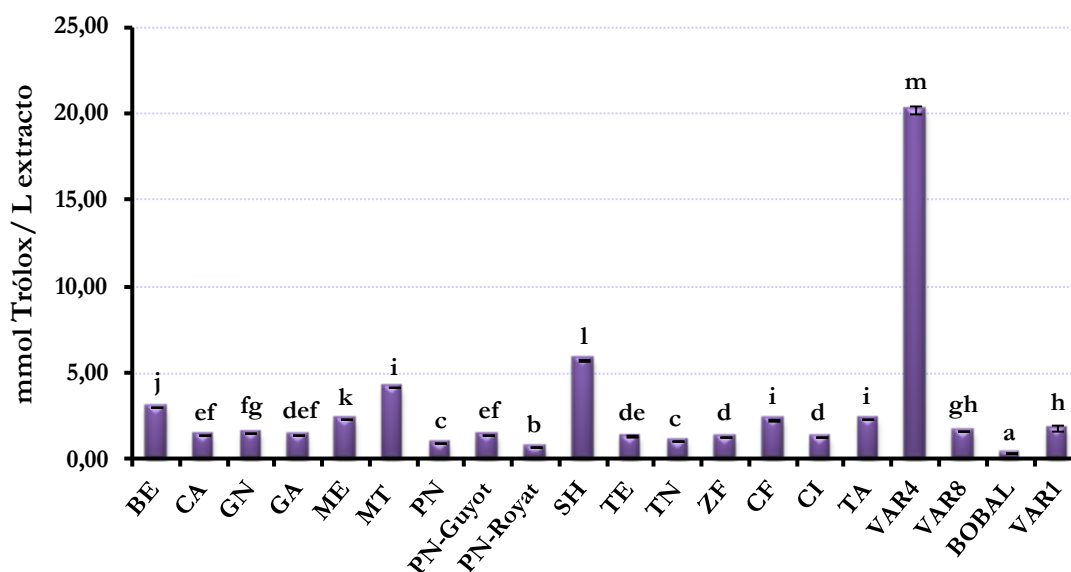


Figura 10. Valores TEAC de los extractos acuosos de 20 variedades de uva tinta. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El patrón del perfil antioxidante de los extractos etanólicos fue semejante al de los extractos acuosos. Únicamente, el extracto etanólico de la variedad Cinsault no se ajustó a este patrón, siendo además, la variedad con mayor actividad antioxidante (Figura 11). Otras variedades con destacada actividad fueron Variedad 4, Syrah y Merlot, coincidiendo con el perfil de los extractos acuosos. Los valores de los extractos etanólicos fueron muy dispares, ya que variaron entre 1.05 y 230.67 mmol Trolox/L extracto.

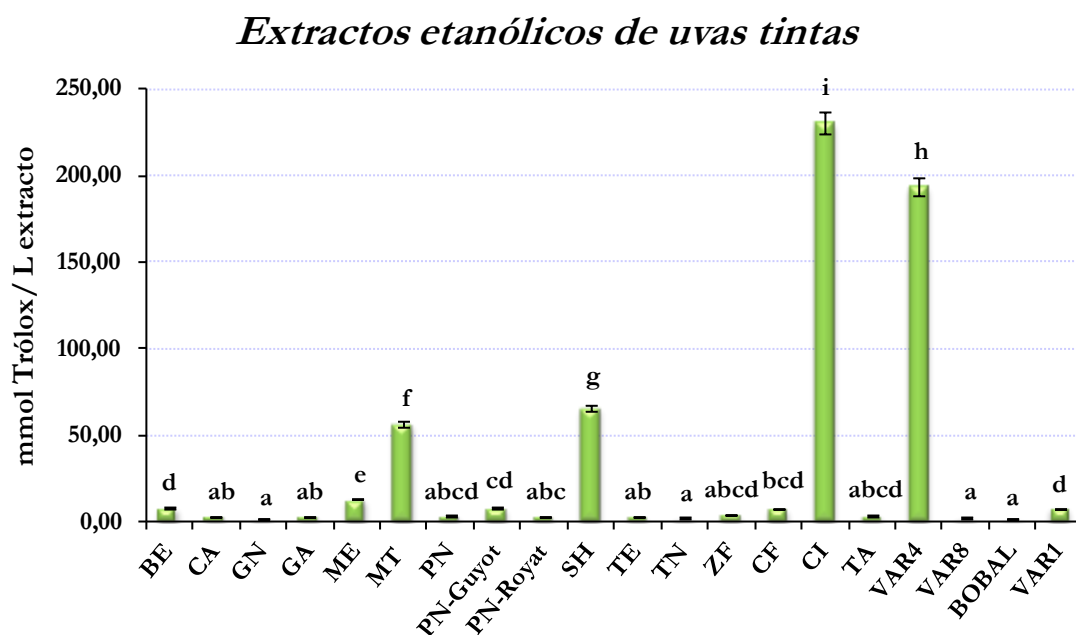


Figura 11. Valores TEAC de los extractos etanólicos de 20 variedades de uva tinta. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Los extractos etanólicos de las variedades de uva tinta presentaron una mayor actividad antioxidante que sus correspondientes extractos acuosos, excepto para Garnacha negra (Nótese que los valores de los extractos acuosos se han multiplicado $\times 10$ para facilitar su observación). Todos los extractos etanólicos de las variedades tintas mostraron un bajo incremento respecto a los acuosos, exceptuando los presentados por las variedades Cinsault, Variedad 4, Syrah y Merlot; entre estas cuatro, la variedad Cinsault fue la que presentó el mayor incremento (Figura 12).

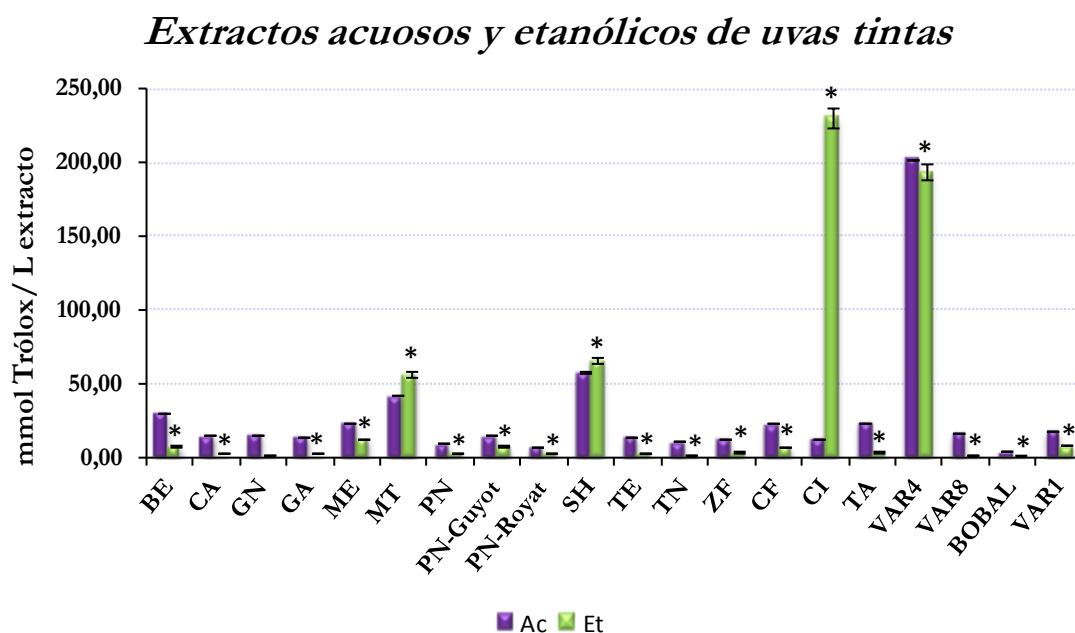


Figura 12. Valores TEAC de los extractos acuosos (x10) y etanólicos de 12 variedades de uva blanca. (*) Diferencias significativas en los extractos etanólicos respecto a los acuosos mediante el análisis de Duncan ($p \leq 0,05$).

Los extractos etanólicos de las uvas tintas presentaron actividades antioxidantes elevadas, coincidiendo con los datos obtenidos por Rockenbach y col. (2011). En general, los extractos procedentes de las uvas tintas mostraron actividades antioxidantes superiores a los procedentes de las uvas blancas. Este hecho puede ser debido a la extracción de ciertos compuestos fenólicos contenidos en los hollejos de las uvas tintas durante el proceso de maceración. Entre estos compuestos presentan una actividad destacada los antocianos y flavanoles, tal y como sugieren diversos autores (Fukumoto y Mazza, 2000; Roussis y col., 2008; Rockenbach y col., 2011).

3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

En este estudio se realizó la determinación del IPT de cada uno de los extractos con el fin de obtener una indicación del contenido aproximado de polifenoles, intentando corroborar una correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de cada uno de ellos.

En la figura 13 se representa la correlación existente entre la actividad antioxidante determinada por el método del DPPH y el contenido fenólico mediante el método del IPT. Dicha correlación resultó elevada, con un $R^2=0.91$, pudiendo confirmarse que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante mostrada en los extractos tanto acuosos como etanólicos de las uvas blancas y tintas.

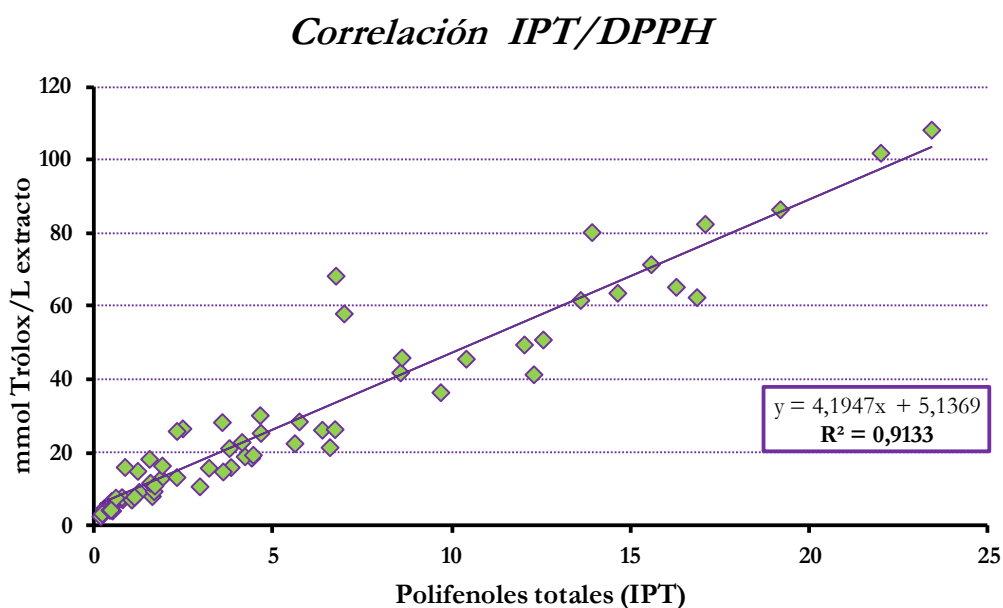


Figura 13. Correlación de los valores TEAC por el método del DPPH y polifenoles totales (IPT) en los extractos etanólicos y acuosos de las uvas blancas y tintas. Datos analizados mediante el test de Pearson ($p \leq 0,001$).

La correlación existente entre la actividad antioxidante determinada por el método del blanqueamiento del β -caroteno y el contenido fenólico mediante el método del IPT resultó ser menos evidente (Figura 14).

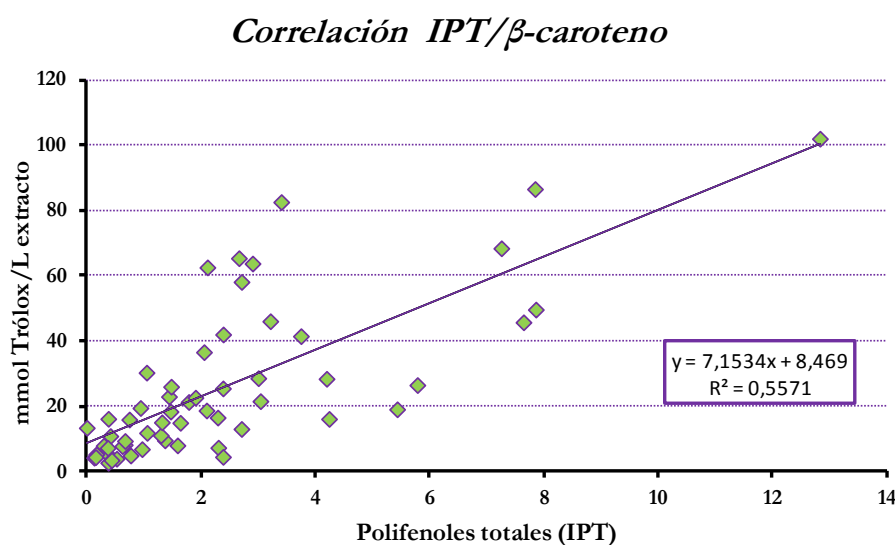


Figura 14. Correlación de los valores TEAC por el método del blanqueamiento del β -caroteno y polifenoles totales (IPT) en los extractos etanólicos y acuosos de las uvas blancas y tintas. Datos analizados mediante el test de Pearson ($p \leq 0,001$).

Debe tenerse en cuenta que el método del DPPH y el del blanqueamiento del β -caroteno se basan en sistemas antioxidantes diferentes. Así, el método del DPPH está basado en un sistema SET, mientras que el del blanqueamiento del β -caroteno se basa en un sistema HAT.

El IPT, está asociado a una excelente correlación con el contenido total de compuestos fenólicos determinado por el método de Folin Ciocalteau, el cual es un sistema SET (Singleton y col., 1999). De este modo, debido a la excelente correlación común entre Folin Ciocalteau e IPT, cabría esperar una buena correlación entre la actividad antioxidante determinada mediante un sistema SET y el contenido total determinado por el IPT, lo cual sucede en este estudio.

ANEXO

Tabla 1. Valores TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas blancas y tintas, determinadas mediante el método del DPPH.

	Variedad (código)	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Uvas blancas	AL	0,461 ± 0,239 ^a	3,804 ± 2,080 ^{cd}
	CH	0,258 ± 0,018 ^a	0,769 ± 0,425 ^{ab}
	CB	2,930 ± 0,214 ^c	4,382 ± 0,062 ^d
	GB	0,462 ± 0,074 ^a	1,848 ± 0,302 ^{ab}
	GB-3,3,6	2,287 ± 0,970 ^{bc}	6,358 ± 1,315 ^c
	MC	0,456 ± 0,024 ^a	0,750 ± 0,301 ^{ab}
	MA	0,241 ± 0,020 ^a	0,580 ± 0,238 ^a
	PA	0,157 ± 0,004 ^a	0,446 ± 0,137 ^a
	RI	0,198 ± 0,027 ^a	4,193 ± 0,351 ^{cd}
	SB	0,485 ± 0,110 ^a	1,025 ± 0,667 ^{ab}
	VG	1,598 ± 0,119 ^a	2,453 ± 0,108 ^{bc}
	XA	0,409 ± 0,027 ^a	1,233 ± 0,190 ^{ab}
Uvas tintas	BE	5,714 ± 1,371 ^{cde}	19,177 ± 2,176 ^{ij}
	CA	1,522 ± 0,060 ^{ab}	6,969 ± 0,188 ^{abc}
	GN	1,101 ± 0,115 ^{ab}	5,589 ± 0,407 ^{ab}
	GA	4,110 ± 0,697 ^{abcd}	16,265 ± 0,382 ^{ghi}
	ME	8,547 ± 2,219 ^c	21,990 ± 0,823 ^{jk}
	MT	3,558 ± 0,638 ^{abcd}	13,907 ± 2,491 ^{fg}
	PN	4,425 ± 0,577 ^{abcd}	8,587 ± 1,571 ^{bcd}
	PN-GUYOT	2,290 ± 1,241 ^{ab}	10,386 ± 0,464 ^{de}
	PN-ROYAT	3,187 ± 0,422 ^{abc}	6,571 ± 0,195 ^{abc}
	SH	6,712 ± 0,221 ^{de}	12,541 ± 0,220 ^{ef}
	TE	1,649 ± 0,313 ^{ab}	16,843 ± 0,404 ^{ghi}
	TN	1,547 ± 0,464 ^{ab}	12,278 ± 0,493 ^{ef}
	ZF	1,670 ± 0,750 ^{ab}	6,740 ± 0,103 ^{abc}
	CF	1,879 ± 0,495 ^{ab}	15,566 ± 1,062 ^{gh}
	CI	1,192 ± 0,368 ^{ab}	17,076 ± 2,783 ^{hi}
	TA	4,640 ± 0,760 ^{bcd}	14,624 ± 1,440 ^{fgh}
	VAR4	13,588 ± 5,455 ^f	23,412 ± 1,868 ^k
	VAR8	3,583 ± 1,163 ^{abcd}	9,673 ± 2,094 ^{cde}
	BOBAL	0,836 ± 0,088 ^a	4,618 ± 0,362 ^a
	VAR1	3,757 ± 0,704 ^{abcd}	12,013 ± 1,729 ^{ef}

*Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Valores TEAC de los extractos acuosos y etanólicos de las uvas blancas y tintas, determinadas mediante el método del blanqueamiento del β -caroteno.

	Variedad (código)	Extracto acuoso	Extracto etanólico
Uvas blancas	AL	$0,340 \pm 0,021^c$	$4,240 \pm 0,244^c$
	CH	$0,767 \pm 0,044^g$	$2,301 \pm 0,087^b$
	CB	$0,412 \pm 0,025^{cd}$	$2,095 \pm 0,119^b$
	GB	$0,965 \pm 0,068^h$	$2,707 \pm 0,091^b$
	GB-3,3,6	$0,000 \pm 0,000^a$	$51,595 \pm 1,587^e$
	MC	$0,165 \pm 0,027^b$	$0,295 \pm 0,021^a$
	MA	$0,520 \pm 0,052^e$	$0,621 \pm 0,028^a$
	PA	$0,374 \pm 0,038^{cd}$	$2,383 \pm 0,158^b$
	RI	$0,433 \pm 0,051^{de}$	$5,432 \pm 0,220^c$
	SB	$0,127 \pm 0,010^b$	$0,367 \pm 0,032^a$
	VG	$0,664 \pm 0,063^f$	$21,602 \pm 0,690^d$
	XA	$0,154 \pm 0,004^b$	$0,668 \pm 0,067^a$
Uvas tintas	BE	$3,001 \pm 0,019^j$	$7,845 \pm 0,376^d$
	CA	$1,465 \pm 0,004^{ef}$	$2,708 \pm 0,160^{ab}$
	GN	$1,586 \pm 0,005^{fg}$	$1,901 \pm 0,145^a$
	GA	$1,438 \pm 0,003^{def}$	$2,662 \pm 0,166^{ab}$
	ME	$2,386 \pm 0,012^k$	$12,832 \pm 0,195^e$
	MT	$4,196 \pm 0,018^i$	$56,469 \pm 1,871^f$
	PN	$0,938 \pm 0,002^c$	$3,212 \pm 0,175^{abcd}$
	PN-GUYOT	$1,476 \pm 0,002^{ef}$	$7,643 \pm 0,354^{cd}$
	PN-ROYAT	$0,743 \pm 0,00^b$	$3,039 \pm 0,121^{abd}$
	SH	$5,785 \pm 0,039^l$	$65,873 \pm 1,862^g$
	TE	$1,366 \pm 0,004^{de}$	$2,901 \pm 0,140^{ab}$
	TN	$1,054 \pm 0,003^c$	$2,111 \pm 0,108^a$
	ZF	$1,296 \pm 0,005^d$	$3,748 \pm 0,269^{abcd}$
	CF	$2,291 \pm 0,006^i$	$7,255 \pm 0,272^{bcd}$
	CI	$1,314 \pm 0,010^d$	$230,669 \pm 6,815^j$
	TA	$2,383 \pm 0,010^i$	$3,403 \pm 0,299^{abcd}$
	VAR4	$20,257 \pm 0,242^m$	$193,653 \pm 5,660^h$
	VAR8	$1,636 \pm 0,006^{gh}$	$2,051 \pm 0,092^a$
	BOBAL	$0,376 \pm 0,001^a$	$1,046 \pm 0,077^a$
	VAR1	$1,782 \pm 0,174^h$	$7,859 \pm 0,000^d$

*Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Para cada tipo de extracto, letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

CAPÍTULO 2.
Materias primas: Vino. Estudio
de procedimientos de reducción
del contenido en etanol

OBJETIVO

Dentro del objetivo general del trabajo de contribuir a la metodología y procedimientos necesarios para el diseño de productos de uso específico para la salud, aplicados concretamente al caso de una bebida cardiosaludable obtenida a partir de vino, el objetivo de este capítulo es estudiar procedimientos de reducción del contenido en etanol del vino que alteren lo menos posible propiedades tanto biológicas como sensoriales.

El objetivo concreto de esta parte del trabajo ha sido el siguiente:

Evaluar comparativamente la tecnología de extracción con CO₂ supercrítico y de ósmosis inversa en cuanto a su capacidad para desalcoholizar vino como materia prima de una bebida funcional.

Para tratar de alcanzarlo se han llevado a cabo las siguientes tareas:

- Extracción de los aromas mediante SFE, con CO₂
- Desalcoholización por SFE, empleando CO₂ con diferentes tipos de vino, para establecer las condiciones adecuadas de desalcoholización.
- Desalcoholización por ósmosis inversa, con diferentes procedimientos, también para su optimización.
- Extracción de aromas, desalcoholización mediante SFE y OI, recuperación y análisis de aromas, y análisis sensorial del producto final, para determinar las mejores condiciones

INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado, una de las hipótesis del presente trabajo de Tesis doctoral atañe al efecto pernicioso para la salud cardiovascular del etanol a dosis altas, pero no a dosis bajas, por lo tanto, para elaborar una bebida saludable a partir de vino se debe eliminar en su mayor parte, pero no en su totalidad.

Por otro lado, el vino es una de las bebidas alcohólicas más complejas. Se han identificado más de 800 compuestos orgánicos volátiles (ácidos, ésteres, alcoholes, aldehidos, lactonas, terpenos, etc.), presentes en muy bajas cantidades (Schreier, 1979), los cuales, en conjunto, son responsables de cada aroma particular. Por todo ello, la producción de vino sin alcohol, eliminando el etanol y conservando las propiedades organolépticas del vino es un problema complejo que supone un reto de considerable dificultad.

Se han empleado varias técnicas para la producción de vino con bajo contenido en alcohol. La más sencilla es el uso de zumo de uva con baja concentración en azúcares, lo que permite la producción de vinos con bajo contenido en etanol, utilizando uvas poco maduras o enzimas que disminuyan el contenido en azúcares del mosto (Pickering, 2000).

Además, existen otras técnicas que reducen el contenido de etanol de un vino normal (más de 9° de alcohol), aunque, en mayor o menor medida, afectarán a las propiedades organolépticas del vino (Catarino y Mendes, 2011). Los sistemas más frecuentemente empleados en la industria son SCC (Spinning Cone Column), destilación a vacío, y sistemas de ósmosis inversa (Belisario-Sánchez y col., 2009), siendo esta última una de las técnicas más prometedoras para la producción de vino con bajo contenido en alcohol, ya que puede operar a bajas temperaturas, y de ese modo no perjudicar tanto el perfil aromático del vino (Labanda y col., 2009).

La eliminación del etanol de soluciones acuosas utilizando CO₂ a altas presiones (fluidos supercríticos) ha sido estudiada exhaustivamente (Brignole y col., 1987; Bunzenberger y Marr, 1988; Brunner y Kreim, 1986), y por ello, la extracción con fluidos supercríticos ha surgido como una alternativa prometedora a las técnicas mencionadas (Schobinger, 1986; Medina y Martínez, 1997; Gamse y col., 1999)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS Y REACTIVOS

- Con objeto de considerar una amplia variedad de tipos de vino, en este estudio se trabajó con tintos, rosados y blancos, proporcionados por Bodegas Torres S.A. (Villafranca del penedés, Barcelona). El contenido en etanol de los vinos para la desalcoholización por SFE era de 9.5 % (v/v) para el vino blanco y 10.5 % (v/v) para el vino tinto. El contenido en etanol del vino rosado para los procesos de desalcoholización por OI ascendió a un 11.9 % (v/v).
- Para la desaromatización y posterior desalcoholización se partió de un vino rosado con 11.3 % (v/v) de etanol.
- Etanol (99.5 %, para ensayos de GC) de Panreac (Barcelona).
- Agua Milli-Q de Millipore (Millipore Billerica, Madrid).
- CO₂, N48 (99.9998%) suministrado por Air Liquide España S.A. (Madrid).

2. MÉTODOS DE DESALCOHOLIZACIÓN POR SFE

2.1. Extracción de etanol con CO₂ supercrítico en contracorriente

El equipo de extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Thar Technology, Pittsburgh, Pensilvania, EEUU) está compuesto por una columna de 2.8 m de altura, rellena en contracorriente, con 2 separadores (S1 y S2), donde tiene lugar una cascada de descompresión. El disolvente (CO₂) se introduce en la columna por la parte inferior y se calienta hasta la temperatura de extracción antes de introducirse en la columna.

Una vez alcanzadas la presión y temperatura, el vino se bombea desde la parte superior de la columna (180 cm de la altura efectiva de la columna) a un flujo constante de 200 mL/h, durante 1 hora. La temperatura de extracción de la columna se mantuvo a 40°C en todos los ensayos experimentales. La presión de extracción varió de 95 a 180 bar; las densidades de CO₂ variaron de 692.3 a 848.9 kg/m³, manteniendo una diferencia de densidad aproximada entre el disolvente y la muestra líquida superior a 100 kg/m³.

El caudal de CO₂ varió de 1.8 a 6.0 kg/h para lograr una relación entre el CO₂ y el vino en un intervalo de 9-30 kg/L. El material extraído se descomprimió hasta 50 bar en el primer separador, mientras que en el segundo se mantuvo cercano a la presión atmosférica. Se estableció una temperatura constante de 35°C en los 2 separadores para todos los ensayos experimentales. Una vez terminada la extracción, se bombeó el CO₂ otros 20 min para extraer la muestra líquida remanente que se podría haber quedado en la columna contracorriente.

De cada extracción se recogieron tres fracciones: dos extractos enriquecidos en etanol, recogidos de los separadores S1 y S2 y un vino desalcoholizado (refinado) procedente del fondo de la columna. Se recogieron 8-13 mL de extracto en el S1 y cantidades inferiores a 2 mL en el S2. El balance de masa cerró en todos los experimentos con una precisión superior al 85 %.

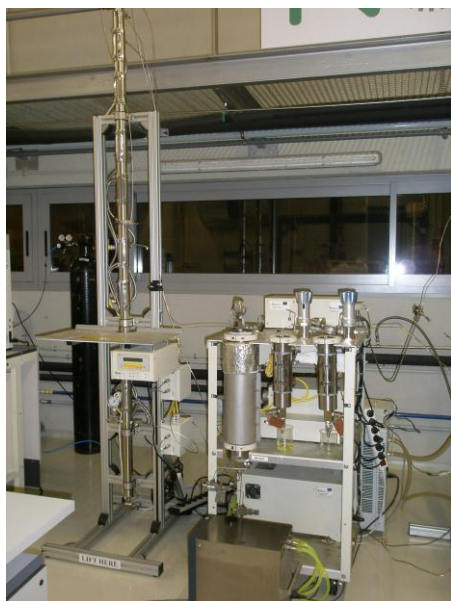


Figura 1. Planta de extracción con fluidos supercríticos, con columna de extracción en contracorriente utilizada en este estudio.

2.2. Recuperación del aroma

Se utilizó el mismo equipo empleado para la eliminación de etanol. En este caso, el vino se introdujo en la columna desde el punto medio (120 cm de la altura efectiva de la columna) para evitar arrastrar la muestra, a un caudal constante durante 4-6 h. Es decir, la columna de extracción se alimentó con una cantidad total de 1000-1500 mL de vino para recuperar una cantidad significativa de aromas en los separadores. La

presión de la extracción se estableció en 95 bar, el caudal de CO₂ se mantuvo en un intervalo de 0.5-1.0 kg/h y la relación CO₂/vino fue de 2-4 kg/L.

De nuevo, la temperatura de la columna de extracción se mantuvo a 40°C en todos los experimentos. El material extraído se descomprimió a 50 bar en el separador 1, mientras que el segundo se mantuvo a presión atmosférica, manteniéndose ambos separadores a 40°C. Una vez finalizada la extracción, el CO₂ se bombeó durante 20 min para ayudar a la extracción de la muestra líquida remanente que podría haber quedado en la columna contracorriente.

Se obtuvieron tres productos de cada una de las extracciones: en el S1 se recogieron 10-30 mL de extracto, en el S2, 1-5 mL, y de la parte inferior de la columna de extracción se recuperó una muestra refinada líquida. El balance de masa se cerró en todos los experimentos con una precisión superior al 95 %.

3. MÉTODO DE DESALCOHOLIZACIÓN POR OI

Se empleó una planta de OI que permite tratar volúmenes de vino del orden de 5-20 L/experiencia. Está dotada de una bomba de altas presiones de pistones (CAT 661, Dimata S.L., Madrid), un variador de frecuencias, capaz de operar a presiones de 1 a 50 bar y caudales de 50 a 2000 L/h, así como un sistema de termostatación que garantiza las condiciones isotérmicas a lo largo de todo el tratamiento (Figura 2). El trabajo de desalcoholización de vino se ha llevado a cabo con la membrana NanoMax-95, que opera con el módulo Helicón RO-4. Ésta es una membrana plana, enrollada en espiral, de poliamida, de 4.6 cm de diámetro, 30.5 cm de longitud, una superficie de filtración de 0.37 m², con un rechazo de NaCl superior al 94 % y de etanol al 40 %, Millipore (Billerica, Massachusetts, Estados unidos) (Figura 3). El proceso se llevó a cabo a una presión de 40 bar y una temperatura de 8-10°C.

Para calcular la transferencia de materia a través de la membrana según los distintos parámetros analizados (STSA, CE, IPT, Etanol...) se ha utilizado la siguiente fórmula:

$$[X]_{\text{permeado}} / [X]_{\text{concentrado}} \times 100$$

$$X = \text{STSA, CE, Etanol, IPT}$$



Figura 2. Planta de desalcoholización



Figura 3. Membrana NanoMax-95

3.1. Permeabilidad al agua y al vino

El test se realizó midiendo el flujo de permeado a distintas presiones. Debido a que éste es demasiado bajo para que se pueda determinar instrumentalmente en línea, se midió recogiendo el permeado en una probeta durante 1 min y se calculó en L/h. Las medidas se hicieron cada 10 min. Este test se realizó tanto para el agua como para el vino (Vino rosado semidulce, de la cosecha de 2008. VR-SD'08).

3.2. Método de desalcoholización de vino por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales

Se añadieron 8 L de agua desgasificada y sulfitada con una disolución de SO_2 (100 mg/L) al depósito de alimentación de la planta de ósmosis inversa, intentando así reducir al máximo el oxígeno del circuito y evitar oxidaciones. Se arrancó la planta de OI en modo de recirculación con un caudal de alimentación de 1010 L/h, presión transmembrana de 38 bar y temperatura dde 8-10°C. Una vez estabilizado el sistema con el agua se añadieron al depósito de alimentación 8 L de vino rosado semidulce, de la vendimia de 2008, por trasiego, en condiciones de mínima aireación, manteniendo las condiciones de operación ya establecidas.

En el primer ciclo de diafiltración se retiraron 8 L de permeado y se añadieron otros 8 L de agua desgasificada y sulfitada, manteniendo en la medida de lo posible una presión constante de 38 bar. Se realizaron otros 6 ciclos de dilución/concentración sobre los 8 L de vino. Al finalizar el último ciclo el vino diafiltrado (desalcoholizado) se concentró hasta 6 L, operación que permite hacer la última dilución con agua hasta el volumen que corresponda a la concentración de etanol deseada.

3.3. Método de desalcoholización de vino por diafiltración discontinua con reducción de volumen

Para la desalcoholización del vino rosado se añadieron 9 L de agua desgasificada y sulfitada con una disolución de SO₂ (100 mg/L) al depósito de alimentación de la planta de ósmosis inversa y se aumentó el caudal de alimentación a 1010 L/h, la presión transmembrana a 38 bar y la temperatura a 8-10°C exactamente igual que se hizo en la desalcoholización anterior. Una vez estabilizado el sistema se añadieron 9 L de vino rosado de la vendimia de 2008, por trasiego, manteniendo estas condiciones de operación.

En el primer ciclo de diafiltración se retiraron 8 L de permeado y se añadieron otros 8 L de agua desgasificada y sulfitada, manteniendo en la medida de lo posible, una presión transmembrana constante de 38 bar para todo el proceso. En el segundo ciclo se retiraron 13.5 L de permeado, de tal manera que los 9 L de vino iniciales, redujeron su volumen a la mitad (4.5 L). En el tercer ciclo se añadieron 4.5 L de agua para volver al volumen inicial, y se volvieron a concentrar hasta la mitad, retirando otros 4.5 L de permeado; de tal manera que los ciclos de dilución/concentración se llevaron a cabo siempre sobre 4.5 L de vino. Se completaron un total de 9 diafiltraciones.

Este mismo proceso se siguió para la desalcoholización de un vino rosado previamente desaromatizado, partiendo de un volumen inicial de 10 L de vino y 10 L de agua. En el primer ciclo de diafiltración se retiraron 10 L de permeado y se añadieron otros 10 L de agua desgasificada y sulfitada. En el segundo ciclo se retiraron 15 L, de tal manera que los 10 L de vino iniciales, en ese momento tenían su volumen reducido a la mitad (5 L). En el tercer ciclo se añadieron 5 L de agua para volver al

volumen inicial, y se volvieron a concentrar hasta la mitad, retirando otros 5 L. Esta operación se repitió hasta completar un total de 9 ciclos de diafiltración.

3.4. Métodos de análisis realizados en el control de desalcoholización mediante OI

- **Sustancias totales solubles en agua (STSA):** se midieron con un refractómetro manual de Atago CO, LTD (Honcho, Itabashi-ku, Tokyo, Japón).
- **Índice de polifenoles totales (IPT):** se midieron con un espectrofotómetro Nanodrop 1000, con espesor de celda de 0.1 mm, de Thermo Scientific (Wilmington, Estados Unidos).
- **pH:** se midió con un pHmetro sympHony de VWR (West Chester, Pensilvania, EE.UU.).
- **Conductividad eléctrica (CE):** se midió con un conductímetro Crison GLP 31+ (Alella, Barcelona).

4. ANÁLISIS DEL AROMA POR GC

La caracterización de la fracción aromática de los extractos de vino se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases GC-2010 (Shimadzu, Kioto, Japón), equipado con un inyector split/splitless, control de presión electrónico, autoinyector AOC-20i, acoplado a un espectrómetro de masas QP-2010, de cuadrupolo simple con ionización de impacto electrónico, y software GCMC Solution.

- Columna capilar: CW-20M (Carbowax), 30 m x 0.32 mm I.D. y 0.25 µm de tamaño de partícula.
- Gas portador: Helio 99.996 %, a un flujo de 58.2 mL/min
- Temperatura del horno: 40°C durante 1 min, aumentada a razón de 2°C/min, hasta 150°C (donde se mantuvo 2 min).
- Modo de inyección: Split (1-30); volumen de inyección: 1µL; temperatura de inyección: 210°C

- Detector: temperatura de la fuente de iones: 230°C; temperatura de interfase: 280°C.
- El espectrómetro de masas se utilizó en modo TIC.
- Las muestras se escanearon de 40 a 500 amu.
- Los compuestos se identificaron por comparación con espectros de masas de la biblioteca 229 Wiley, y por índices de retención lineal.

5. ANÁLISIS SENSORIAL DEL VINO DESALCOHOLIZADO

La evaluación de la calidad de los extractos obtenidos en condiciones supercríticas de los separadores S1 y S2 se hizo en base a la semejanza, basada en un test olfativo del aroma de estos extractos respecto del vino de partida. Estos extractos aromáticos se evaluaron con un panel de 6 catadores semientrenados (4 mujeres y 2 hombres, de entre 25 y 50 años), que juzgaron la similitud de los aromas. Se empleó una escala no estructurada anclada en los bordes (20) para puntuar la similitud entre el aroma de los extractos y su correspondiente vino; el anclaje derecho representaba el aroma del vino original. Por ello, cuanto más alta era la puntuación, mayor era la similitud entre el aroma de los extractos supercríticos y el del vino de partida. Para el análisis estadístico de los datos se consideró la distancia (en cm), medida desde el borde izquierdo hasta el punto marcado por el catador

La evaluación de la bebida funcional fue llevada a cabo por el mismo panel semientrenado de 6 miembros, considerando un test olfativo, gustativo y visual, según las hojas de cata mostradas en el anexo.

6. ANÁLISIS DE ETANOL

El análisis de etanol se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, EEUU), equipado con un inyector split/splitless programado (PSS) y un detector de ionización de llama (FID). El equipo se acopló al software cromatográfico Perkin-Elmer, de Turbochrom (Norwalk, Connecticut, EEUU).

La fase estacionaria empleada fue una columna capilar de sílice fundido de Quadrex Corp. (New Haven, Connecticut, EEUU), de 30 m x 0.25 mm I.D, cubierta por una capa de 0.25 μm de Carbowax 20M (polietilenglicol).

Condiciones cromatográficas:

- Temperatura de inyección: 210 °C
- Temperatura del detector: 280 °C
- Gas portador: Helio a 15 psig
- Relación split: 1:20
- Volumen de inyección: 1 μL
- Temperatura del horno: 39 °C durante 3 min, se aumentó a razón de 5°C/min, hasta 65°C (donde se mantuvo 1 min), y posteriormente a 200°C, a 40°C/min, y se mantuvo 1 min.

Para evaluar el contenido en etanol se preparó una curva de calibrado utilizando etanol del 1 % al 20 % (v/v).

7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

7.1. Ensayo del DPPH

La capacidad de los vinos para reducir el radical libre DPPH[•] se determinó de forma análoga a la medida de actividad antioxidante de las uvas, según el método propuesto por Brand-Williams y col. (1995). Se añadieron 25 μL de vino o patrón (previamente diluidos) a 0.975 μL de una solución $6 \cdot 10^{-5}\text{M}$ de DPPH[•] en metanol. De igual modo, se realizaron controles sustituyendo el extracto por el mismo volumen de disolvente. La reacción tuvo lugar en ausencia de luz hasta alcanzar la estabilización. Como un patrón de referencia se utilizó el Trolox, y los resultados se expresaron como valor TEAC (mmol Trolox/g extracto). Todos los análisis se hicieron por triplicado.

7.2. Ensayo del ORAC (Oxygen radical absorbance activity)

Con objeto de obtener datos más comparables, la actividad antioxidante se determinó esta vez por el ensayo ORAC, adicionalmente al DPPH. El ensayo del ORAC se llevó a cabo según el método descrito por Huang y col. (2002). Para este ensayo se utilizaron placas de fluorescencia de 96 pocillos (Microfluor 2, de ThermoScientific, España) y un lector de placas (Infinite M2000, de Tecan, España).

La disolución de trabajo de fluoresceína ($8 \cdot 10^{-8}$ M), preparada diariamente, se obtuvo a partir de una disolución madre de fluoresceína ($8 \cdot 10^{-4}$), ambas en un tampón fosfato 75 mM (pH=7.4). A todos los pocillos de la placa se les añadieron 150 μ L de solución de trabajo de fluoresceína. Además, a los pocillos blanco se les adicionaron 50 μ L de buffer 75 mM mientras que a los controles se les adicionaron 25 μ L de tampón, a los patrones 25 μ L de dilución de Trolox, y a las muestras 25 μ L de vino previamente diluido en buffer fosfato.

Las reacciones se iniciaron por la adición de 25 μ L de una solución AAPH (2, 2'-Azobis (2-metilpropionamidina dihydrocloruro) 166 mM. La solución de AAPH se preparó diariamente, disolviéndola en buffer 75 mM.

Los resultados se expresaron como valor TEAC (mmol Trolox/L muestra). Todas las muestras se determinaron por triplicado.

8. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Al igual que en el caso de las uvas, el contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) del vino se determinó con el reactivo de Folin-Cicalteau, mediante el método de Singleton y col. (1999). A 3 mL de agua destilada se le adicionaron 50 μ L de muestra o patrón. Se añadieron 250 μ L del reactivo de Folin-Cicalteau, y se agitó intensamente. Tras 3 min se añadieron 750 μ L de Na_2CO_3 (20 % p/v) y 950 μ L de agua. La mezcla se agitó vigorosamente y se guardó durante 2 h en ausencia de luz. La absorbancia fue medida a 760 nm. El TPC de los vinos se expresó como GAE (mg ácido gálico/L vino). Todas las muestras se hicieron por triplicado.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.0. Para la comparación de las diferencias de las medias de las distintas bebidas se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de comparaciones múltiples de Duncan, a un nivel de significación de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DESAROMATIZACIÓN Y DESALCOHOLIZACIÓN MEDIANTE EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO (SFE)

Ruiz-Rodriguez y col. (2010), desarrollaron un modelo predictivo que simula matemáticamente la eliminación de etanol de bebidas alcohólicas (brandy, vino y sidra) con CO₂ supercrítico en contracorriente. Los resultados obtenidos se correspondían con los datos experimentales de la literatura, y así el modelo se utilizó para estimar las condiciones del proceso necesarias para lograr una reducción del contenido de etanol del 10 % a valores por debajo del 1 % (peso).

1.1. Extracción de etanol

Se realizaron extracciones de vino blanco y tinto en diferentes condiciones con la planta de fluidos supercríticos descrita en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos.

En la tabla 1 se recogen las diferentes condiciones de extracción estudiadas (presión y relación CO₂/vino) a 40°C para la eliminación de etanol de vino blanco (9.5 % v/v etanol) y tinto (10.5 % v/v etanol). Además se muestran los correspondientes contenidos en etanol obtenidos de los refinados.

Es importante conocer que para la misma relación CO₂/vino, la densidad del CO₂ define el grado de desalcoholización conseguido: a mayor densidad de CO₂, menor contenido de etanol en el refinado. Esto se observa en los experimentos 1 y 4 de esta tabla, donde para la misma relación CO₂/vino (9 kg/L), cuanto mayor es la densidad (0.820 g/cm³ y 0.516 g/cm³, respectivamente), menor contenido de etanol hay en el refinado (3.5 % y 5.5 %, respectivamente). De los resultados obtenidos se deduce claramente que una variable crítica en el proceso de desalcoholización es la relación CO₂/vino, como ya mencionaron previamente otros autores (Medina y Martínez, 1997; Gamse y col., 1999). Además, estudios previos a la modelización termodinámica del proceso supercrítico de desalcoholización (Ruiz-Rodriguez y col., 2010) demostraron que son necesarias relaciones de CO₂/vino mayores de 30 kg/L, a bajas temperaturas, para lograr reducir el etanol del vino, del 10 al 1 % (peso). En los

ensayos se llegó a la misma conclusión: una relación de CO₂/vino de 29-30 kg/L (Exps. 3 y 6 de la Tabla 1) aseguró casi una completa desalcoholización de los vinos estudiados en unas condiciones de temperatura de 40°C y presión de 95 bar. Los resultados obtenidos cuando se combinaron las mayores densidades de CO₂ con una baja relación CO₂/vino (Exp.1) no fueron mejores que los obtenidos utilizando las densidades más bajas de CO₂ pero altas relaciones de CO₂/vino (Exps. 3 y 6).

Tabla 1. Eliminación de etanol por CO₂-Supercrítico de vinos blanco y tinto a 40°C.

	Experimento (Exp)	Presión (MPa)	Densidad CO ₂ (g/cm ³)	CO ₂ /vino (kg/L)	Etanol en refinado (% peso)
Vino blanco	1	18	0.820	9	3.5
	2	13	0.742	12	2.1
	3	9.5	0.516	29	<1
	4	9.5	0.516	9	5.5
Vino tinto	1	9.5	0.516	11	3.5
	2	9.5	0.516	30	<1

1.2. Extracción de aromas

Para estudiar la recuperación del aroma del vino utilizando CO₂ supercrítico se utilizaron los mismos vinos que para los experimentos de desalcoholización (blanco y tinto). La clave para lograr el objetivo fue utilizar una baja relación CO₂/vino. Considerando las instalaciones del equipo experimental, la relación CO₂/vino varió entre 2 y 4 kg/L, en los diferentes experimentos.

Las bajas relaciones de CO₂/vino implican que la muestra líquida es la fase continua, y el disolvente supercrítico es la fase dispersa. Por ello, el disolvente se satura con los componentes del aroma (que están presentes en el vino en muy bajas cantidades), mientras que se extraen pequeñas cantidades de etanol. Por el contrario, durante los ensayos de desalcoholización (relación CO₂/vino = 9-30 kg/L), el disolvente CO₂ supercrítico era la fase continua, mientras que el vino era la fase dispersa. En este

caso, tanto los compuestos del aroma como el etanol fueron extraídos casi en su totalidad.

Se realizó una valoración sensorial de los extractos obtenidos de cada uno de los separadores (S1 y S2), tal y como se detalla en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la recuperación del aroma de vino blanco y tinto a 40°C y 95 bar, así como la puntuación del panel de cata en las diferentes extracciones. El tiempo total de extracción para cada uno de los experimentos fue de 4 h, y en todos ellos la columna de extracción se alimentó con 1 L de vino. Las extracciones 1 y 2 de la tabla 2 son duplicados de las extracciones obtenidas para el vino blanco, mientras que la 3 y 4 corresponden a duplicados del vino tinto.

Tabla 2. Recuperación de aromas de vino blanco y tinto a 40°C y 95 Atm. y puntuación de la valoración sensorial obtenida en los diferentes ensayos, con su desviación estándar (SD).

Vino	Extracción (Ext)	Flujo vino (L/h)	Flujo CO ₂ (kg/h)	CO ₂ /vino (kg/L)	Extracto S1			Extracto S2		
					mL	Ptos	SD	mL	Ptos	SD
Blanco	1	0.23	0.60	2.6	11	15.0	0.7	4.3	17.3	0.7
	2	0.23	0.60	2.6	10.8	15.5	1.4	4.0	19.1	0.7
	3	0.23	0.60	2.6	5.2	3.1	1.0	0.5	2.4	0.8
Tinto	4	0.23	0.90	3.8	13.5	16.0	0.8	1.0	17.0	1.4

Comparando las cantidades (mL) de los extractos obtenidos en cada ensayo de vino blanco, se puede decir que se consiguió una buena reproducibilidad. Sin embargo, en el caso del vino tinto se obtuvieron cantidades significativamente bajas de extracto al aplicar la misma relación de CO₂/vino (2.6 kg/L) que en el caso del vino blanco (Ext 3 en Tabla 2). Por ello, para la cuarta extracción se aumentó esta relación de CO₂/vino a 3.8 kg/L.

Analizando las puntuaciones de los panelistas de los extractos 1, 2 y 4 se observó que mientras que el refinado tenía color y ningún olor, las muestras obtenidas en ambos separadores, S1 y S2, eran completamente transparentes y muy aromáticas. Esto se reflejó en las altas puntuaciones otorgadas. Esto significa que tuvieron una elevada similitud con el aroma original de los vinos blanco y tinto de partida. Por el contrario, el refinado obtenido en el extracto 3, mantenía sólo parte del olor característico del vino.

Según la tabla 2, en los separadores se obtuvieron unos 14 mL/L vino (Exts 1, 2 y 4); aunque en el caso del vino blanco, la cantidad de extracto recuperado en el S2 fue mayor que en el caso del vino tinto. Más aún, las cantidades de extracto recuperados en estos experimentos son significativamente menores que las cantidades de extracto obtenidas en la desalcoholización (50-75 mL/L vino).

Respecto a los aromas, la figura 4 muestra una comparación entre los cromatogramas correspondientes al vino blanco de partida, los extractos recuperados en los separadores 1 y 2 y el refinado obtenido del fondo de la columna de extracción (Ext. 1, Tabla 2)

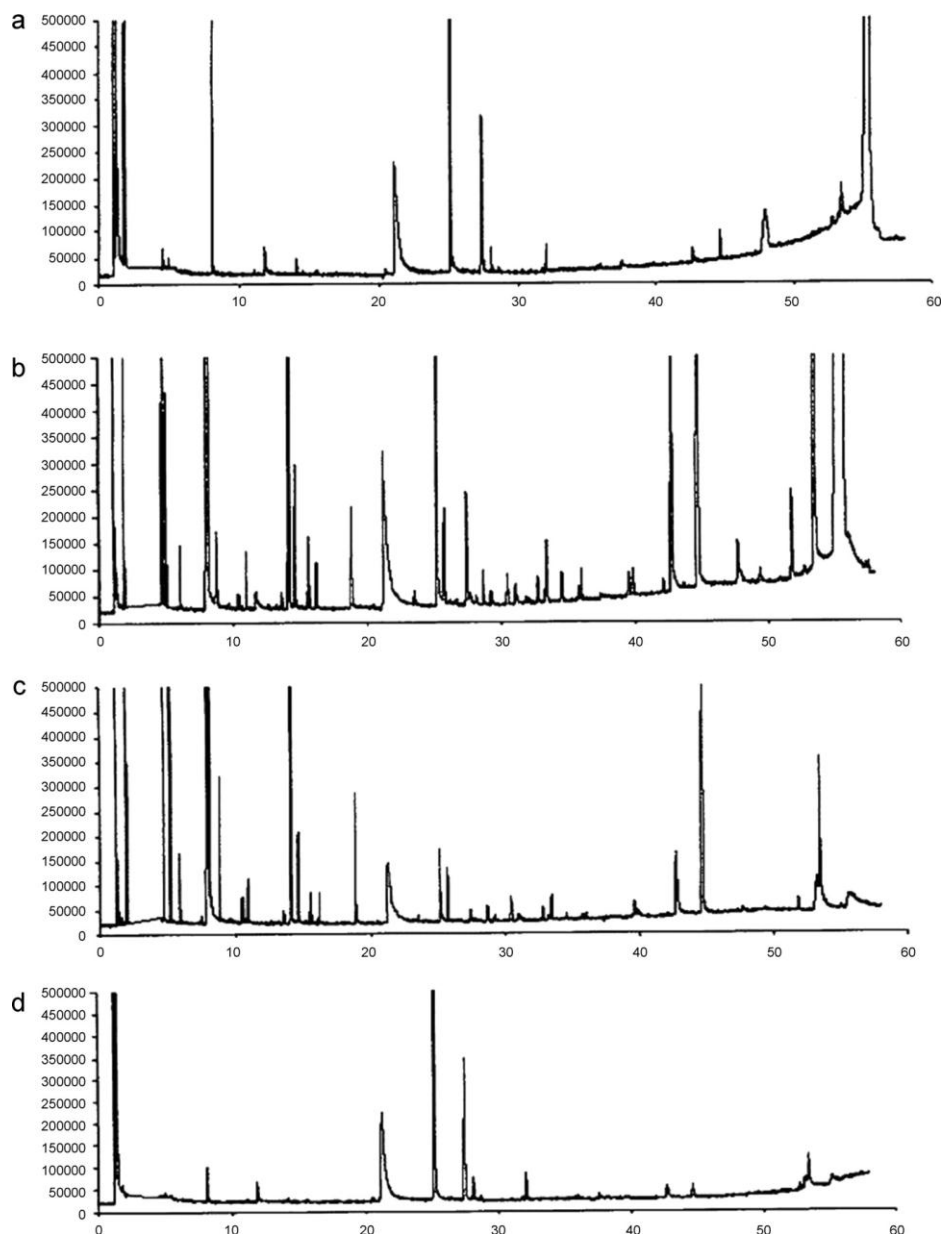


Figura 4. Recuperación de aromas de vino blanco: comparación entre los cromatogramas obtenidos por GC-MS del vino de partida (a), separador 1 (b), separador 2 (c) y refinado (d).

Como se puede observar en la figura 4, los extractos de los separadores 1 y 2 del vino blanco tenían un mayor contenido y diversidad en compuestos aromáticos, mientras que los refinados contenían pequeñas cantidades de aroma, comparados con el vino de partida. En el caso del vino tinto, los cromatogramas siguieron el mismo patrón.

Como muestras, se presentan las figuras 5 y 6, que contienen la identificación de picos de los cromatogramas de los extractos procedentes del S1 de los experimentos

descritos en la tabla 2. La figura 5 corresponde al S1 recuperado del vino blanco, mientras que la figura 6 se refiere al S1 del vino tinto. Cualitativamente, ambos extractos mostraron perfiles cromatográficos muy similares, siendo compuestos como el 3-metil-1-butanol, etil lactato, ácido acético, 2,3-butanoldiol y fenil etil alcohol, los que presentaron picos con mayores áreas.

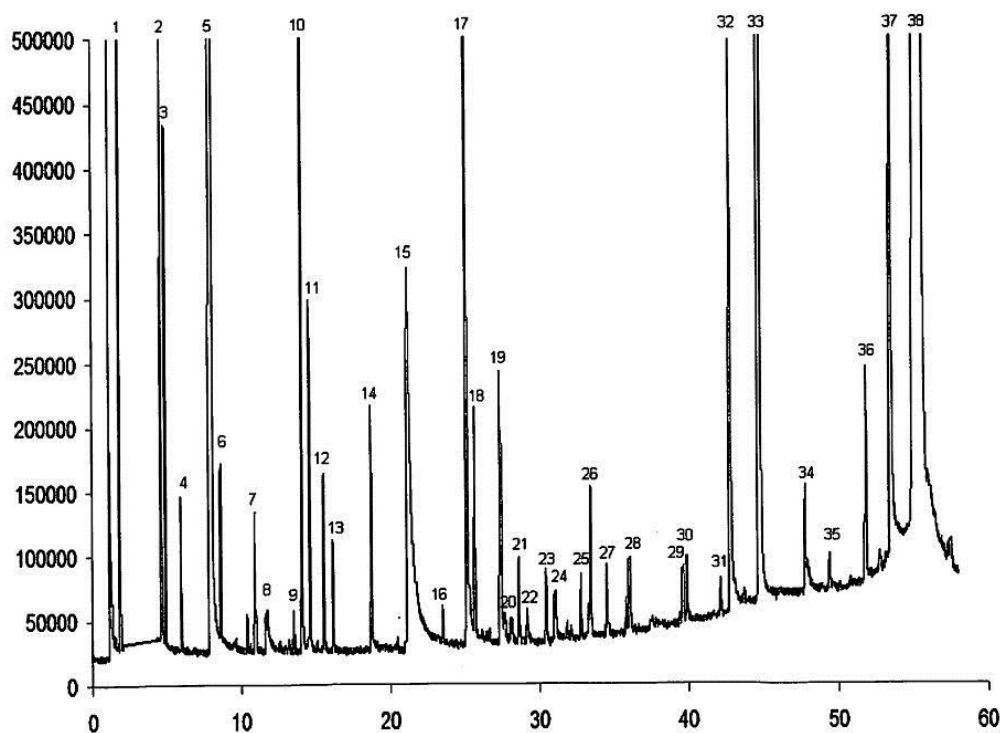


Figura 5. Cromatograma correspondiente al extracto del separador S1 del vino blanco (Ext. 1 de la Tabla 2): (1) Etil acetato, (2) 2-metil-1-propanol, (3) isoamil acetato, (4) n-butanol, (5) 3-metil,1-butanol, (6) etil hexanoato, (7) hexil acetato, (8) 2-butanon-3-hydroxy-, (9) ácido,metil éster 2-hidroxi-isobutírico, (10) etil lactato, (11) 1-hexanol, (12) 3 etoxi-1-propanol, (13) 3-hexen-1-ol, (14) etil octanoato, (15) ácido acético, (16) ácido butanoico, 3-hidroxi-etil éster, (17) 2,3-butanodiol, (18) linalool, (19) etanol, 2-methoxyethanol, (20) 1,2 propanodiol, (21) 2(3H)-furanona, dihydro-, (22) Ho-trienol, (23) NI-I, (24) ácido butanoico, (25) ácido butanodioico, dietil éster, (26) ácido isovalérico, (27) 3-metil tiol propanol, (28) 1,3 propanodiol, diacetato, (29) ácido acético, 2-feniletil éster, (30) NI-II, (31) Nerol, (32) N-(3-metilbutil)acetamida, (33) fenil etil alcohol, (34) etil-2-hidroxi-3-fenilpropionato, (35) 3,7-dimetilooct-1-en-3,7-diol, (36) dietilhidroxibutanodiato, (37) ácido caprílico y (38) glicerol. NI: compuesto no identificado.

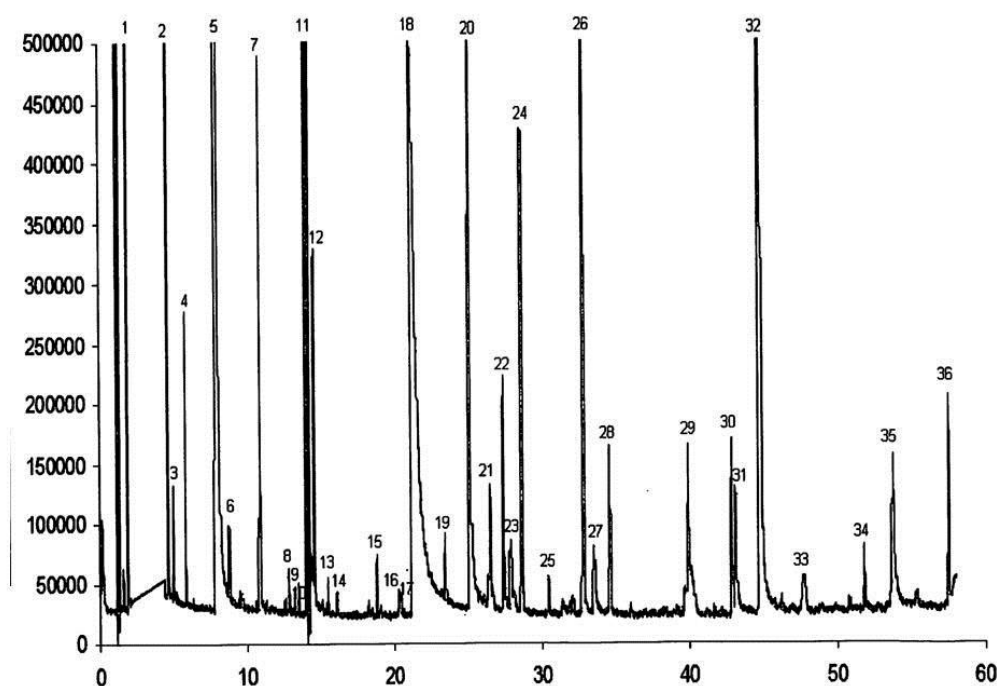


Fig. 6. Cromatograma correspondiente al extracto del separador S1 del vino tinto (Ext. 4 de la Tabla 2): (1) Etil acetato, (2) 2-metil-1-propanol, (3) isoamil acetato, (4) n-butanol, (5) 3-metil,1-butanol, (6) etil hexanoato, (7) 2-butanona,3-hidroxi-, (8) ácido propanoico, 2-hidroxi-, metil éster, (9) 1-pentanol, 3-metil-, (10) ácido 2-hidroxi-isobutírico, metil éster, (11) etil lactato, (12) 1-hexanol, (13) 3-etoxi-1-propanol, (14) 3-hexen-1-ol, (15) etil octanoato, (16) tert-butoximetoxi, metano, (17) 2-furancarboxaldehído, (18) ácido acético, (19) ácido butanoico, 3-hidroxi-etil éster, (20) 2,3-butanodiol, (21) butano,1-metoxi-3-metil-, (22) etanol, 2- metoxietanol, (23) ácido propanoico, 2-metil, (24) 2(3H)-furanona, dihidro-, (25) NI-I, (26) ácido butanodioico, dietil éster, (27) ácido isovalérico, (28) 3-metil tiol propanol, (29) NI-II, (30) N-(3-metilbutil) acetamida, (31) NI-III, (32) feniletil alcohol, (33) etil-2-hidroxi-3-fenilpropionato, (34) dietilhidroxibutanodiat, (35) ácido caprílico y (36) dietil-2-hidroxi-pentanodiat. NI: compuesto no identificado.

Además, en la tabla 3 se presenta una comparación entre las áreas de los picos de diferentes compuestos identificados en los vinos blanco y tinto de partida, sus correspondientes extractos del separador 1 y sus factores de concentración de los aromas (Ext.1 y Ext. 4, Tabla 2). Todos los análisis se llevaron a cabo empleando el mismo método y las mismas condiciones (apartado 4 de Materiales y Métodos). Así, las áreas de los picos se utilizaron para estimar los factores de concentración (área del pico del extracto/área del pico del vino de partida) de algunos de los compuestos aromáticos de las muestras. Los factores de concentración de hasta 50 se pudieron calcular con los resultados de los análisis de GC-MS. Sin embargo, hay que señalar que hay varios compuestos que están en baja cantidad en el vino de partida y sólo se

identificaron en el extracto. Por ejemplo, varios alcoholes (n-butanol, 3-metil-1-pentanol, 1-hexanol, 3-etoxi-1propanol, 3-hexen-1-ol, 3-metil-tiol-propanol), ácidos (ácido 3-OH-etil ester-butanoico, ácido 2-metil-propanoico, ácido isovalérico, 2-OH-etil-3-fenilpropionato, dietilhidroxibutanodiato, ácido caprílico, 2-OH-dietil-pentanodiato), ésteres (isoamil acetato, etil hexanoato, etil octanoato), aldehidos (2-furancarboxaldehido) y éteres (1-metoxi-3-metil-butano) sólo se pudieron detectar en el S1, y así se espera que se lograran factores de concentración muy altos para estas sustancias.

Tabla 3. Áreas cromatográficas obtenidas de los vinos de partida blanco y tinto, sus extractos del separador S1, y sus factores de concentración (F.C.).

Compuesto	Vino tinto partida	Ext S1	F.C.	Vino blanco partida	Ext S1	F.C.
Etil acetato		14,467,940		435,666	2,426,845	5.5
2-metil-1propanol	975,555	28,864,100	29.6	109,003	3,912,918	35.8
Isoamil acetato		266,518		39,232	970,959	24.7
n-butanol		597,800			250,831	
3-metil-1-butanol	6,561,474	193,130,059	29.4	2,388,696	80,286,813	33.6
Etil hexanoato		210,295			428,792	
2-butanona-3-hidroxi	139,081	1,782,147	12.8		419,858	
2-OH-ácido propanoico, metil éster		113,465				
1-pentanol, 3-metil		70,898				
2-OH-ácido isobutírico, metil éster		106,333			112,343	
Etil lactato	2,632,592	a		113,486	4,502,179	39.6
1-hexanol		1,159,865			1,104,771	
3-etoxi-1-propanol		141,465			585,211	
3-hexen-1-ol		68,231			356,465	
Etil octanoato		241,426			913,778	
Tert-butoximetoxi, metano		46,473				
2-furancarboxialdehido		52,418				
Ácido acético	3,957,189	11,090,461	2.8	2,718,497	4853,654	1.7
Ácido butanoico, 3-OH-etil éster		287,263			113,535	
2,3 butanodiol	7,363,015	7,351,706	1.0	4,847,819	6,003,315	1.2
Butano, 1-metoxi-3-metil		412,724				
Etanol, 2-metoxietanol	1,990,796	1,210,931	0.6	1,454,593	1,101,019	0.7
Ácido propanoico, 2-metil		435,945				
2 (3H)-furanona, dihidro	213,612	2,277,658	10.7		318,510	
NI-I		169,072			274,144	
Ácido butanodioico, dietil éster	310,726	15,553,593	50.1		240,541	
Ácido isovalérico		518,754			556,190	
3-metil tiol propanol		759,264			318,564	
NI-II		624,306			204,675	
N-(-3-metilbutil) acetamida		774,003		148,988	3,344,450	22.4
NI-III		890,390				
Feniletil alcohol	1,339,270	50,154,470	37.4	266,131	13,382,241	50.2
2-OH-etil-etil-3- fenilpropionato		461,626			365,617	
Dietilhidroxibutanodiato		289,933			883,418	
Ácido caprílico		1,466,425		326,871	6,561,929	20.0
Glicerol				18,646,191	57,968,750	3.1
2-OH-dietil-pentanodiato		1,035,159				

^a Área cromatográfica demasiado elevada, que conlleva una respuesta saturada del detector.

2. DESALCOHOLIZACIÓN MEDIANTE ÓSMOSIS INVERSA

El proceso de desalcoholización de vinos no es un simple tratamiento en el que el alcohol se sustituye por agua, sino que es una secuencia de tratamientos que incluye operaciones de acondicionamiento de la membrana frente a algún fluido de referencia (agua), test de permeabilidad de la membrana al vino, selección de las condiciones óptimas de operación, selección de los parámetros más indicativos para llevar a cabo el proceso en las condiciones requeridas, lavado (regeneración) de las membranas y conservación, entre otras.

Según la experiencia adquirida, uno de los mejores resultados de desalcoholización se ha obtenido con la membrana NanoMax-95 de Millipore, que se caracteriza por tener un rechazo al NaCl superior al 94 % y un rechazo al etanol del 40 %, motivo por el que se ha utilizado esta membrana en este trabajo. Los parámetros determinados fueron los siguientes:

Permeabilidad al agua

Para ello se utilizó agua desmineralizada con una conductividad de $4 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, y se fijaron los parámetros con influencia directa sobre la permeabilidad de la membrana: temperatura de 20°C y caudal de alimentación de 1020 L/h. Se varió la presión de 10 a 40 bar, en intervalos de 10 bar.

En la figura 7 se muestra cómo el aumento del flujo del permeado siguió una tendencia lineal con el aumento de la presión transmembrana, aumentando la presión de 10 a 40 bar aprox., lo que indica que la respuesta de la membrana en este intervalo de presiones era lineal.

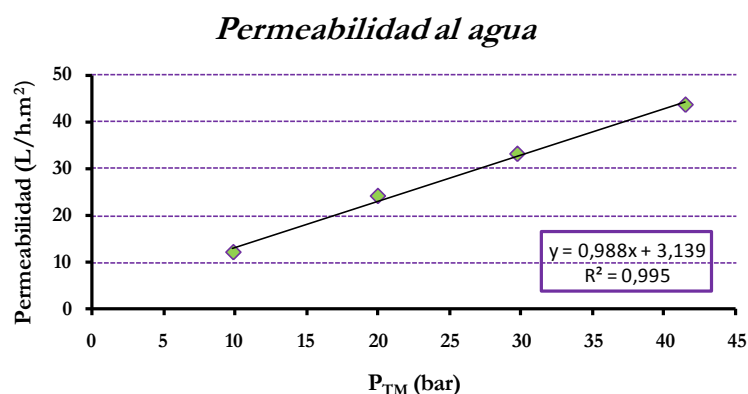


Figura 7. Membrana NanoMax-95. Permeabilidad al agua a P_{TM} 10-40 bar, 9-10 °C

Permeabilidad al vino

Una vez establecidas las condiciones de separación, se pasó a comprobar la permeabilidad de la membrana NanoMax-95 al propio vino. Igual que se procedió con la permeabilidad de la membrana al agua, se fijaron todos los parámetros de influencia directa sobre la permeabilidad de la membrana: 20°C de temperatura y un caudal de alimentación de 1020 L/h variando la presión transmembrana a 20, 30 y 40 bar.

Como se muestra en la figura 8, la permeabilidad de la membrana se mantuvo estable a 20, 30 y 40 bar. Esta permeabilidad aumentaba con el incremento de la presión de 20 a 40 bar.

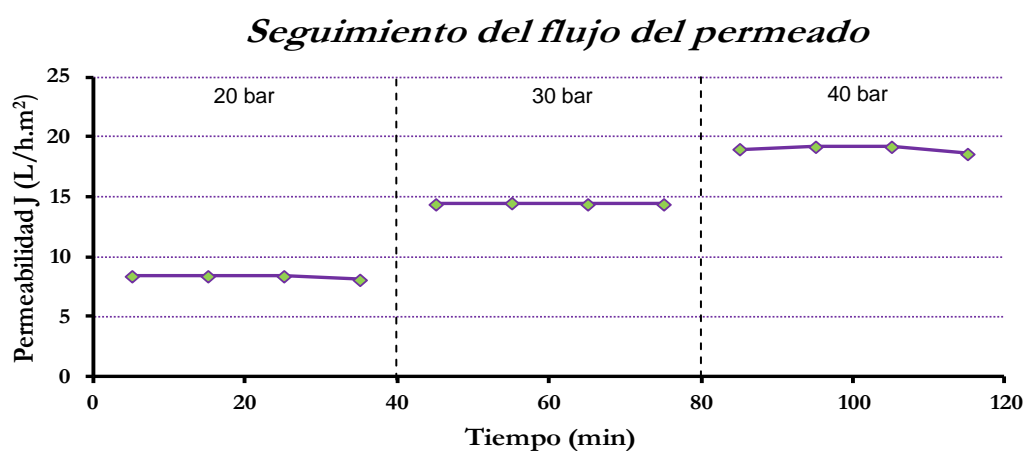


Figura 8. Membrana NanoMax-95, Millipore. Seguimiento del flujo de permeado en la filtración al VR-SD'08.

En la figura 9 se muestra cómo el aumento del flujo de permeado seguía una tendencia lineal con el aumento de la presión transmembrana, en el intervalo de 20 a 40 bar aprox., lo que indicaba que las condiciones de operaciónse podían mantener en cualquiera de estas presiones.

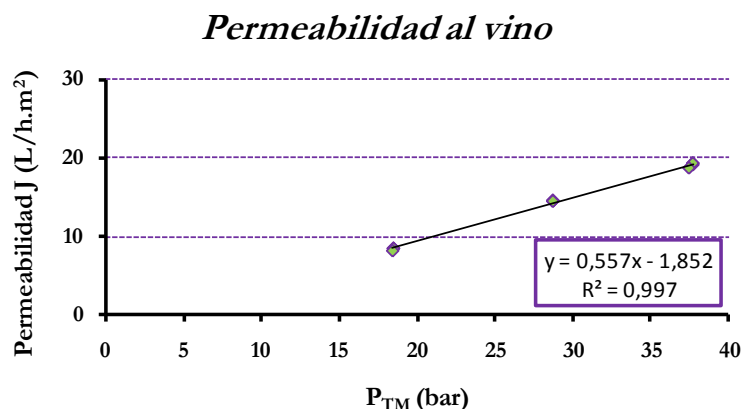


Figura 9. Membrana NanoMax-95. Permeabilidad al vino a P_{TM} 20-40 bar, 9-10.5°C

Además del test de las condiciones de operación se tomaron datos de algunos de los parámetros de mayor importancia en la estimación de la transferencia de materia a través de la membrana, detallados en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos:

Sustancias totales solubles en agua (STSA)

En este caso se trata de las sustancias totales disueltas en vino. Éste es un parámetro muy genérico que mide el contenido de todos los compuestos disueltos en agua (el vino es una solución acuosa), incluso el etanol. Por tanto, puede dar una idea del efecto de la separación entre todas las moléculas que tengan una respuesta positiva (mayor de cero) de refracción y se encuentren en el vino. El etanol, como compuesto mayoritario, representa la mayor parte de las STSA, por lo que se espera que los valores que alcance se deban principalmente a este compuesto. Se expresa en g de sustancias disueltas/100 mL de vino (% o °Brix). Tiene la gran ventaja de ser una medida prácticamente instantánea con un gasto de muestra mínimo (1-2 gotas).

Como se puede apreciar en la figura 10, la cantidad de sustancias totales solubles en vino que atravesaron la membrana pasaron del 1.6 al 1.1 %, lo que representa una disminución del 55 al 38 % en la transferencia de las sustancias totales solubles en vino (ver línea de tendencia de $STSA_{trans}$). Se aprecia claramente que la tendencia a disminuir de la transferencia de sustancias totales solubles en vino se debe al aumento de presión (55 % a 20 bar frente a menos del 40 % a 40 bar).

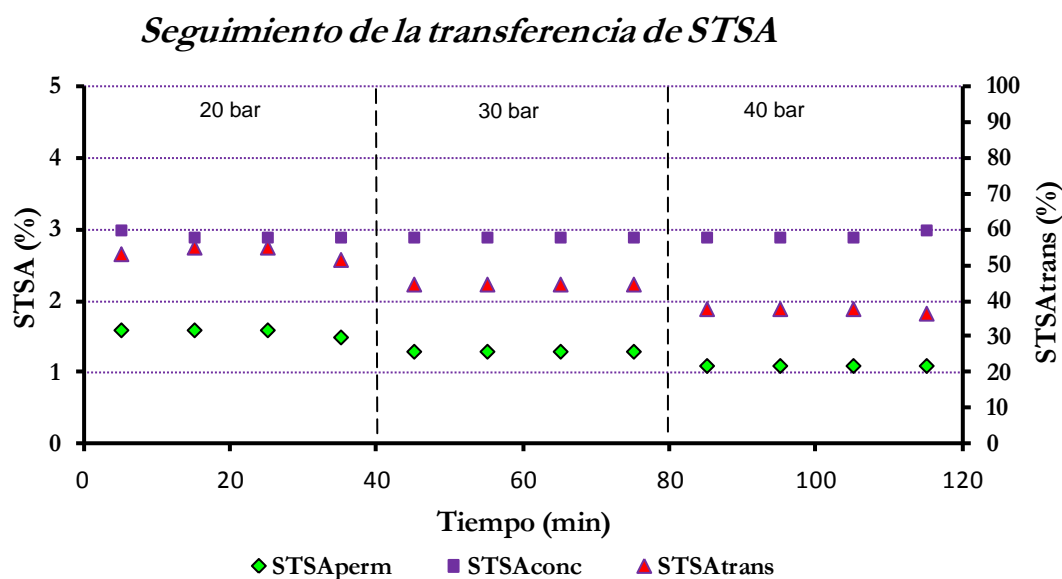


Figura 10. Membrana NanoMax-95. Permeabilidad al vino VR-SD'08. Seguimiento de la transferencia de sustancias totales solubles en agua a distintas presiones.

Conductividad eléctrica (CE)

Expresa la corriente eléctrica que las especies disueltas pueden transmitir cuando se encuentran entre dos electrodos con un determinado potencial eléctrico entre ellos. Las especies disueltas (en agua) de mayor capacidad para conducir la electricidad son las que presentan mayor capacidad de ionizarse (disociarse), es decir, las sales o los electrolitos. La CE de las especies ionizables es directamente proporcional a su concentración. Resulta una forma genérica de medir la concentración del conjunto de sales en una disolución compleja y, por tanto, es una medida importante en los tratamientos por ósmosis inversa, ya que indica la cantidad de sales que están atravesando la membrana. Puesto que las sales son las especies más pequeñas, la mayor parte de la CE viene determinada por iones como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- ,

SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , NO_3^- , entre otros (los iones monovalentes pueden atravesar una membrana de ósmosis inversa). Si existe una pérdida de CE indica que ha habido una transferencia de estos compuestos en el permeado.

La medición de la CE es también muy rápida, necesita muy poca cantidad de muestra, e incluso es recuperable tras su medida. Es susceptible de automatización, es decir, el electrodo medidor de la CE se puede colocar en línea y medir la CE en continuo.

En la figura 11 se aprecia que la CE del concentrado del vino rosado tratado fue mucho mayor que la del permeado, para cada una de las presiones estudiadas, lo que indicaba que sólo una parte relativamente pequeña de las sales atravesaron la membrana: del 14 al 10 %. Se observó también que el aumento de la presión no tenía demasiada influencia en la transferencia de sales, ya que una diferencia de 20 bar producía sólo una variación del 4 % en la transferencia de sales.

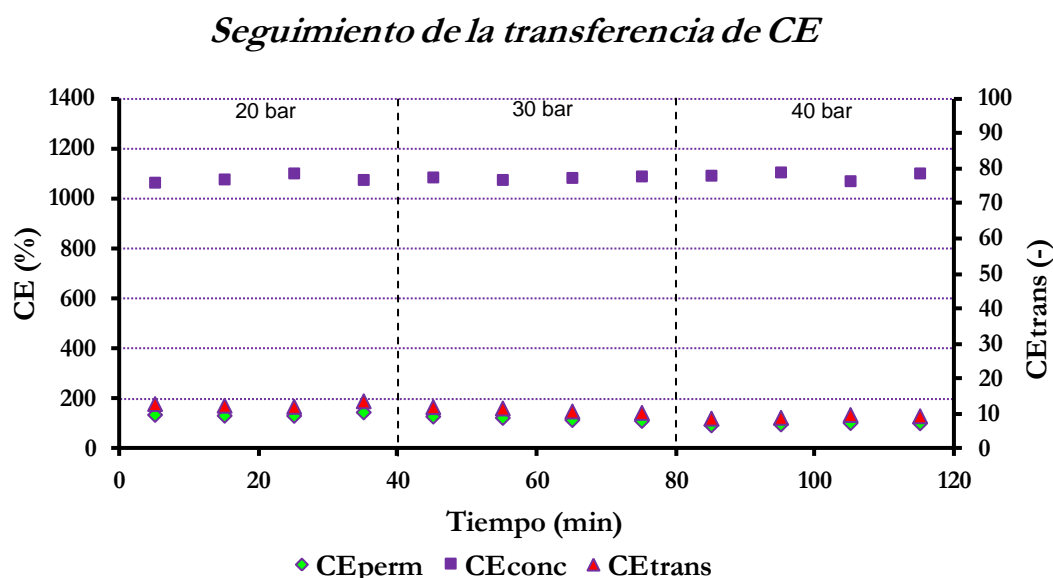


Figura 11. Membrana NanoMax-95. Permeabilidad al vino VR-SD'08. Seguimiento de la conductividad eléctrica a distintas presiones.

pH

Es una medida de transferencia de acidez a través de una membrana e indica si hay una separación prioritaria de los compuestos que proporcionan esta acidez. Los principales ácidos del vino son: tartárico, málico y cítrico, por lo que si hay un cambio de pH se deberá a una transferencia de éstos a través de las membranas.

Al igual que las medidas anteriormente mencionadas, es una valoración rápida, que necesita de muy poca cantidad de muestra, y se puede obtener en tiempo real de operación.

En la figura 12 se ve que el pH del permeado del vino rosado tratado fue mayor que el del concentrado, y esa diferencia se mantuvo a lo largo del tiempo e independientemente del cambio de presiones. En el permeado había más ácidos que bases, por lo que cabía esperar la posibilidad de encontrar algunos de los ácidos mencionados previamente (puesto que son moléculas pequeñas).

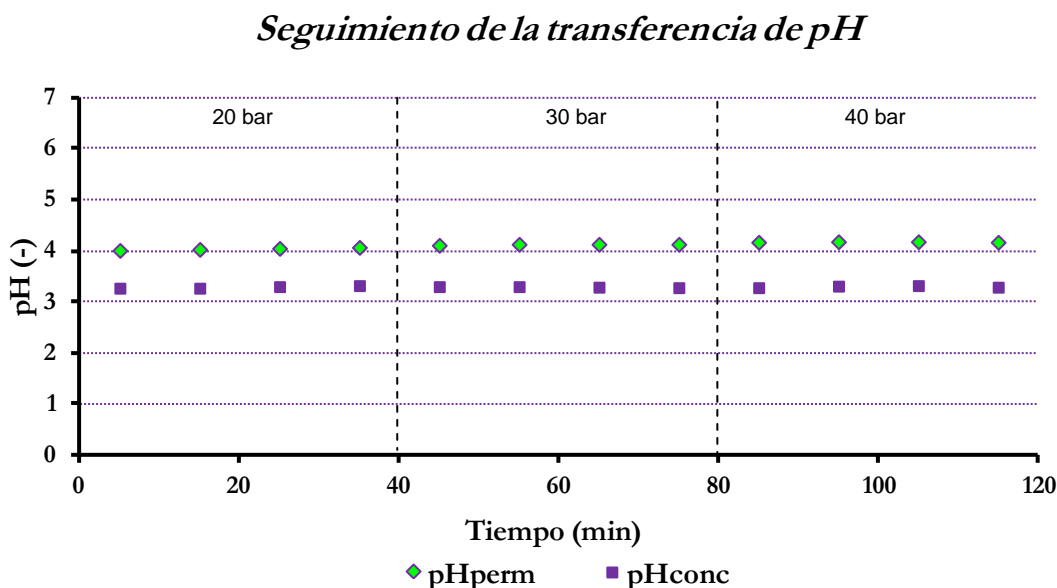


Figura 12. Membrana NanoMax-95. Permeabilidad al vino VR-SD'08. Seguimiento (cinética) del pH a distintas presiones.

Contenido en etanol

Se trata de la medida más específica de transferencia de materia a través de la membrana de todas las realizadas. Se ha medido por cromatografía de gases tal y como está descrito en el apartado 6 de Materiales y Métodos.

En la figura 13 se ve cómo el contenido en etanol disminuyó ligeramente en el concentrado, mientras que el permeado disminuyó considerablemente según aumentaba la presión. La transferencia de etanol mantenía la misma tendencia que la del permeado: constante para una misma presión transmembrana y tendencia a disminuir según aumentaba ésta. Cuanto más se aumentaba la presión, mayor era la resistencia de la membrana al paso del alcohol, por lo que se dificultaba su transferencia al permeado.

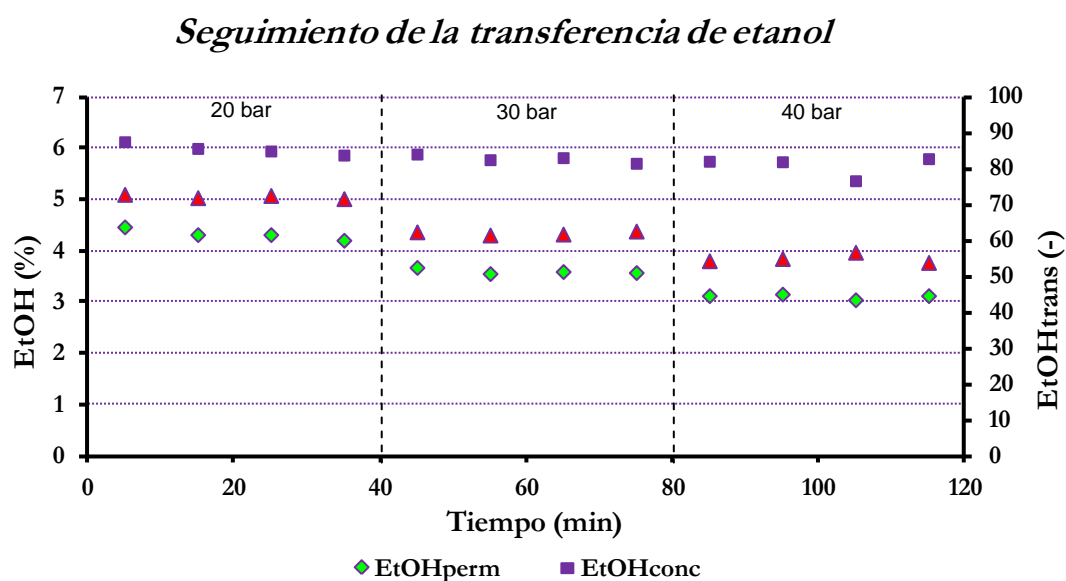


Figura 13. Membrana NanoMax-95. Permeabilidad al vino VR-SD'08. Seguimiento de la separación del etanol a distintas presiones.

Una vez obtenidos estos datos, se fijaron los parámetros para realizar la diafiltración en las dos modalidades ya descritas: un caudal de recirculación de 1010 L/h y una presión transmembrana de 38 bar. Aunque parezca paradójico que a esta presión la transferencia de etanol sea la más baja (42 %), si volvemos al test de los parámetros de operación (Fig 8) se puede ver que a 38 bar se obtuvo un caudal de permeado de 18

L/hm², que es mucho más alto que los 7 L/hm² a 18 bar. En este caso, se asumieron ciertas pérdidas de tiempo en la diafiltración por trabajar a niveles de transferencia de etanol menores. Además, el sistema y la membrana eran perfectamente aptos para trabajar en estas condiciones de operación.

2.1. Desalcoholización por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales

2.1.1. Procedimiento de trabajo

Se trabajó con un vino rosado. El tratamiento comenzó con la adición de agua, y no de vino, porque así era más probable que no hubiera procesos de oxidación, ya que al arrancar el sistema, éste purga la bomba y el circuito de rechazo, pudiéndose introducir el aire en el vino, y dar lugar a una oxidación indeseable.

Tras eliminar el etanol del vino según el procedimiento de trabajo detallado en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos, el balance material final se resume a continuación: se añadieron un total de 56 L de agua desgasificada y sulfitada sobre 8 L de vino. Se retiraron 58 L de permeado y 6 L de vino diafiltrado, es decir, el vino desalcoholizado se quedó ligeramente concentrado para compensar las pérdidas de alcohol que formaban parte del volumen total del vino de partida y para permitir un ajuste de la concentración final del etanol residual, algo que es preferible hacer (desde el punto de vista tecnológico) por dilución con agua que por concentración adicional. Todo esto se llevó a cabo en un tiempo total de 9.5 h.

2.1.2. Seguimiento de los parámetros de operación

En la figura 14 se puede apreciar la disminución del caudal de permeado (J) en cada uno de los siete ciclos de diafiltración (dilución/concentración) realizados. Además, se muestra cómo aumentaba la permeabilidad según lo hacía el número de diafiltraciones; sin embargo, disminuía desde que se añadía el agua hasta que terminaba la correspondiente diafiltración, proceso más acusado según avanzaba el número de diafiltraciones.

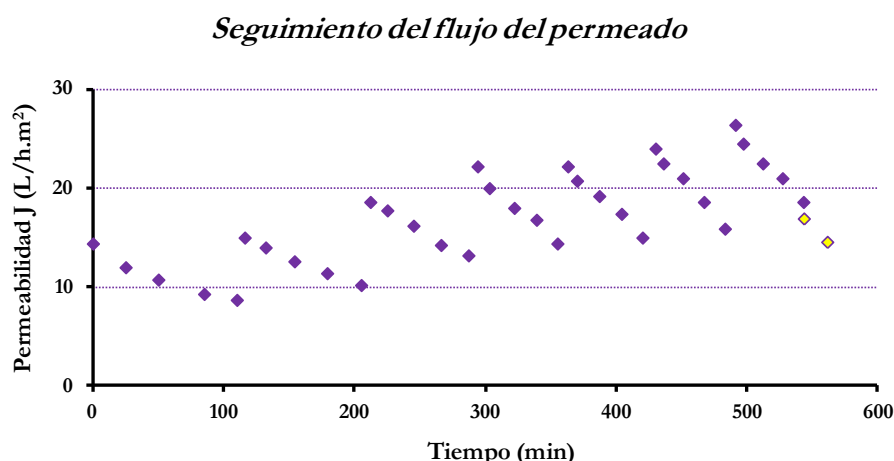


Figura 14. Membrana NanoMax-95. Seguimiento del flujo del permeado en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales.

En el primer ciclo de diafiltración el caudal del permeado (J) disminuyó en $5.7 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ (de 14.4 a $8.7 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$), mientras que en el última la reducción fue de $7.8 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ (de 26.4 a $18.6 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$). Cabe destacar que el efecto más importante de la diafiltración se observó en el tiempo de operación, que disminuyó progresivamente con el aumento del número de ciclos de dilución/concentración, de 110 min en el primero a 58 min el último (Figura 14). En lo que se refiere al proceso de diafiltración global, se ve que el caudal de permeado aumentó con el tiempo o con la disminución de sustancias totales solubles en agua llegando a duplicarse al final (Figuras 14 y 15). Los dos últimos puntos corresponden a una sobreconcentración que se implementa normalmente para facilitar el ajuste del grado alcohólico.

2.1.3. Seguimiento de la transferencia de materia

Sustancias totales solubles en agua (STSA)

En la figura 15 se muestra el efecto de la diafiltración sobre el contenido de sustancias totales del vino. En primer lugar se ve con mucha claridad el aumento de los sólidos totales del vino, tanto del concentrado como del permeado, correspondiente a la fase de concentración, y la disminución de los STSA en cada ciclo de la diafiltración. Se ve también que este aumento fue mucho más acusado en el concentrado (de 2.7 al 4.2% ,

en el primer ciclo de la diafiltración) que en el permeado (de 0.9 a 1.4 %, también en el primer ciclo de la diafiltración).

Asimismo, es evidente que mientras el efecto de la concentración de las sustancias totales se mantuvo durante todo el proceso de la diafiltración, esta tendencia desapareció en el permeado a partir del cuarto ciclo de diafiltración o a partir de una disminución de casi el 60 % en los sólidos totales del vino (del 2.7 %, al comienzo de la primera diafiltración, a un 1.8 % al inicio de la cuarta) en el concentrado, lo que indicaba que el proceso de diafiltración tenía un efecto de desplazamiento de estos sólidos con agua mucho más eficaz al principio (cuando su concentración era mayor).

Cabe destacar que una parte importante de las sustancias totales solubles en el vino, correspondía al etanol, lo que llevó a ciertas confusiones a la hora de evaluar el efecto de la diafiltración sobre los STSA, ya que en el proceso de desalcoholización global lo que importa es que se transfiera la mayor parte posible de etanol al permeado, pero que el resto de los STSA queden retenidos. Estos resultados se confirmaron también por la cinética de la transferencia de sólidos totales del vino a través de la membrana, que incluso desplazaron la aparición de este efecto al quinto ciclo de diafiltración, donde la tendencia de transferencia de las STSA se estabilizaba en una posición prácticamente horizontal.

Seguimiento de la transferencia de STSA

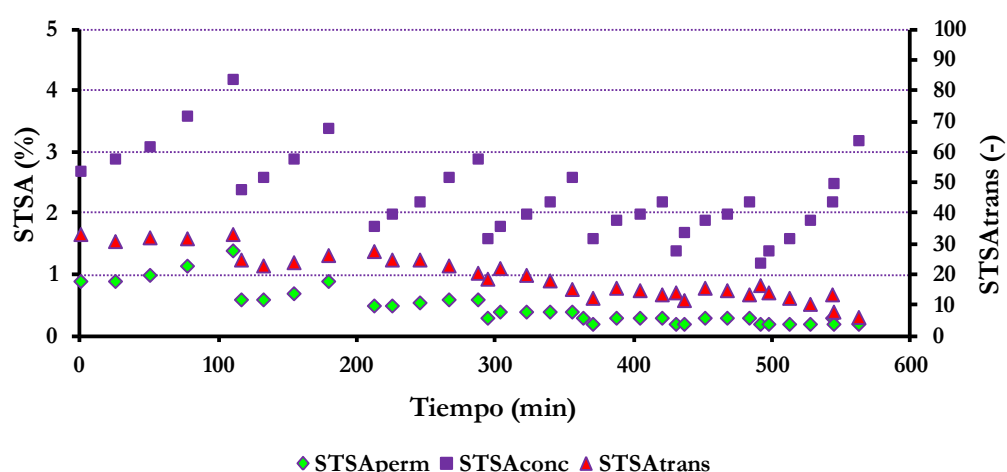


Figura 15. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia de STSA en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales.

Contenido en etanol

Ya que se trata de un tratamiento de desalcoholización, el efecto de mayor importancia en la diafiltración es, sin duda, el contenido de etanol en el vino, como se ilustra en la figura 16. En primer lugar se puede ver que la permeabilidad de la membrana al etanol fue de un 44-52 % al principio y un 25-29 % al final del tratamiento, lo que indica que para agotar el etanol de la parte del concentrado era necesario que éste pasase por varios ciclos de dilución/concentración. Además, se ve que el contenido en etanol del concentrado aumentaba en cada uno de los ciclos de concentración y disminuía bruscamente en las etapas de dilución durante la diafiltración.

La cinética del permeado seguía el mismo patrón que el del concentrado, pero con un contenido en etanol bastante más bajo. Cabe destacar que esta diferencia era mucho más evidente al principio [1.57% (de 5.34 a 6.91 %)] que al final de la diafiltración [0.28% (de 0.95 a 1.23 %)]; esto es debido a la menor transferencia de etanol, cuando su presencia en el concentrado disminuye considerablemente (tendencia del $\text{EtOH}_{\text{trans}}$ de la figura 16). Finalmente, se puede decir que en las condiciones de desalcoholización aquí estudiadas se llegó al contenido deseado en etanol, de 2.06 % (v/v) después de 7 ciclos de dilución/concentración en un tiempo total de 9.5 h.

Estos resultados, se asemejan mucho a los obtenidos por Bogianchini y col. (2011), al desalcoholizar un vino, en su caso tinto, hasta 1.77 % (v/v), empleando la técnica de ósmosis inversa, en condiciones muy similares a las aquí descritas.

Seguimiento de la transferencia de etanol

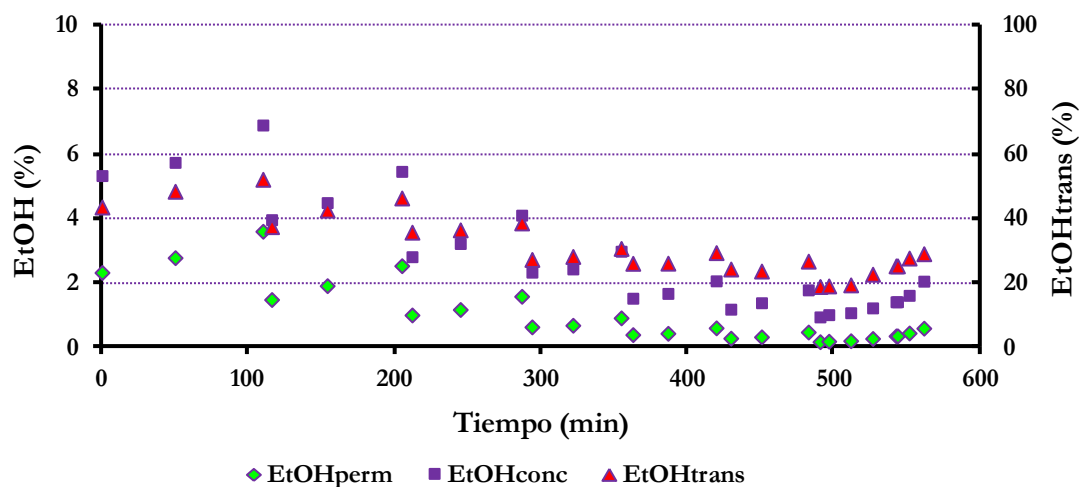
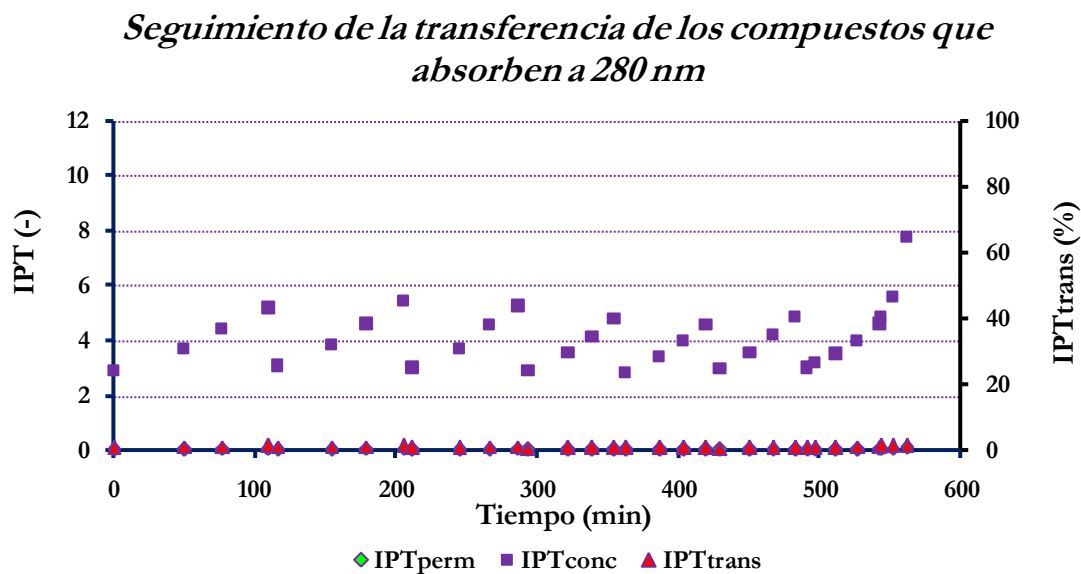


Figura 16. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia del etanol en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales.

Índice de polifenoles totales (IPT)

Para controlar las posibles pérdidas de compuestos fenólicos durante el proceso de diafiltración se midió la absorbancia a 280 nm de los flujos de rechazo y permeado del vino. En la gráfica de la figura 11 se muestra la evolución del índice de polifenoles totales, tanto en el permeado como en el concentrado durante el proceso de desalcoholización.

A)



B)

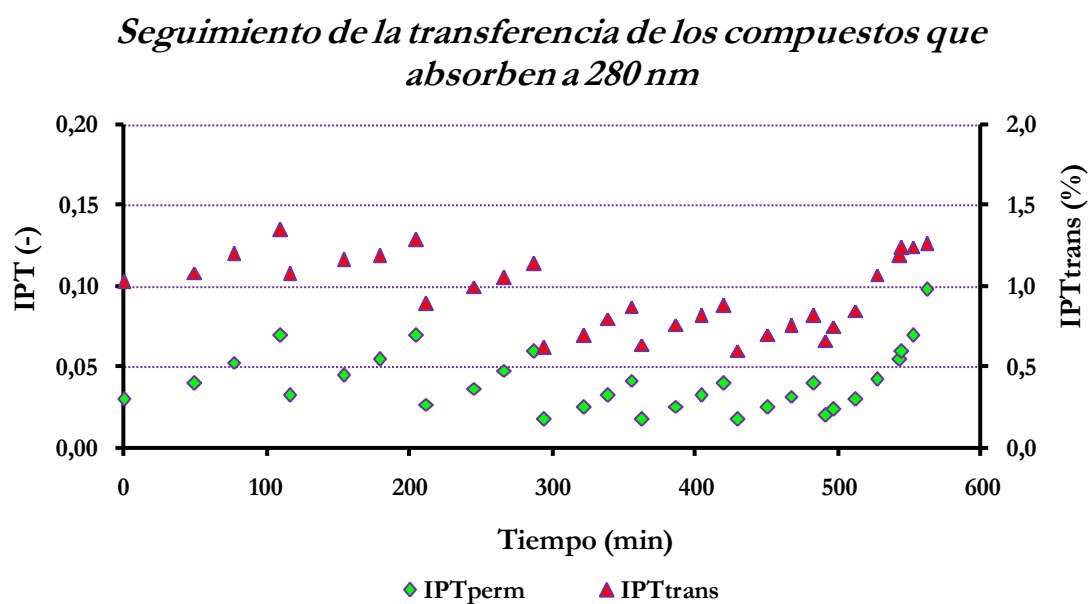


Figura 17. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia de compuestos que absorben a 280 nm; a) escala de 0-12 unidades de IPT; b) escala de 0.0-0.2 unidades de IPT, en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con diluciones secuenciales.

En primer lugar se puede ver que los compuestos que absorbían a 280 nm (básicamente compuestos fenólicos) se quedaron retenidos casi por completo en el concentrado (Figura 17a). Sólo una ínfima parte de estos compuestos, correspondientes a 0.03-0.06 unidades de IPT atravesó la membrana (Figura 17b), lo que representaba menos del 1 % de retención en comparación con el vino de partida. Estos resultados confirmaron que la membrana elegida tenía un alto rechazo a los compuestos que se absorbían a 280 nm. Cabe destacar que el IPT del vino de partida diluido era de 2.9.

Se aprecia también que el IPT aumentaba según progresaba la concentración en cada etapa de la diafiltración. Además, la tendencia de aumento de éste en cada ciclo de concentración era muy parecida, mostrando una ligera disminución en los puntos finales de cada ciclo, hasta alcanzar un 4.5 %, al final del quinto ciclo. Esto indica que si las etapas de concentración siempre se llevaban a cabo con precisión (en lo que a volúmenes de permeado retirado se refiere) se debía asumir una cierta pérdida de compuestos fenólicos.

Estos resultados determinaron unos niveles de transferencia de compuestos fenólicos de 0.6 a 1.3 %. Además, se demuestra que cuanto más largo sea el proceso de diafiltración, mayores serán las pérdidas de compuestos fenólicos.

2.2. Desalcoholización por diafiltración discontinua con reducción de volumen

2.2.1. Procedimiento de trabajo

En una segunda aproximación se llevó a cabo un proceso de desalcoholización por reducción discontinua del volumen del mismo vino. En realidad el tratamiento fue un modelo híbrido entre diafiltración por diluciones secuenciales y reducción de volumen. Se realizó para aprovechar las ventajas de la diafiltración por diluciones secuenciales al principio de la desalcoholización, y posteriormente se pasó al modo de reducción. Puesto que 2/3 partes de la diafiltración se realizaron por reducción de volumen, finalmente a este tratamiento nos referimos como diafiltración discontinua por reducción de volumen.

En este tratamiento, un total de 9 L de vino rosado se sometieron a un proceso de desalcoholización por diafiltración con agua desgasificada y sulfitada. La diafiltración se llevó a cabo en 2 ciclos de diluciones/concentraciones sucesivas (de 18 a 9 L) y en 7 ciclos de concentraciones/diluciones (de 9 a 4.5 L) con un volumen total de 48.5 L de agua (5.4 L de agua por 1 L de vino) y en un tiempo total de casi 9 h. Se obtuvieron 4.5 L de vino diafiltrado (desalcoholizado), es decir, el vino desalcoholizado se quedó concentrado a la mitad, para poder ser diluido al grado alcohólico deseado en una última fase de dilución. Se retiraron 53 L de aguas de permeado.

2.2.2. Seguimiento de los parámetros de operación

En la figura 18 se muestra cómo evolucionó el caudal de permeado en las distintas etapas de la diafiltración. Se pueden observar los periodos de disminución del permeado en cada ciclo de dilución/concentración. Esta disminución se hizo más acusada a medida que transcurría la diafiltración: el permeado del primer ciclo disminuyó en $4.2 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$, mientras que el último lo hizo en $5.5 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$, y además en menos tiempo. Cabe destacar que este efecto coincidió con la disminución de las STSA en el permeado, lo que derivó en una menor resistencia de la membrana hacia el flujo del vino (Figuras 18-19).

Por el contrario, la permeabilidad aumentó según lo hicieron los ciclos de diafiltración. Esto se aprecia con más claridad desde el tercer ciclo de concentración, cuando se pasó a la diafiltración por reducción de volumen, donde el flujo del permeado fue de $7.5 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$, mientras que al final de la última concentración el caudal ascendió a $20.0 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$.

Un efecto importante también observado es la reducción de tiempo empleado para los diferentes ciclos de concentración/dilución: exceptuando el segundo ciclo, en el que se retiró un mayor volumen de permeado (por lo que el tiempo fue mayor), el primer ciclo se llevó a cabo en 77 min, mientras que el último se completó en apenas 29 min.

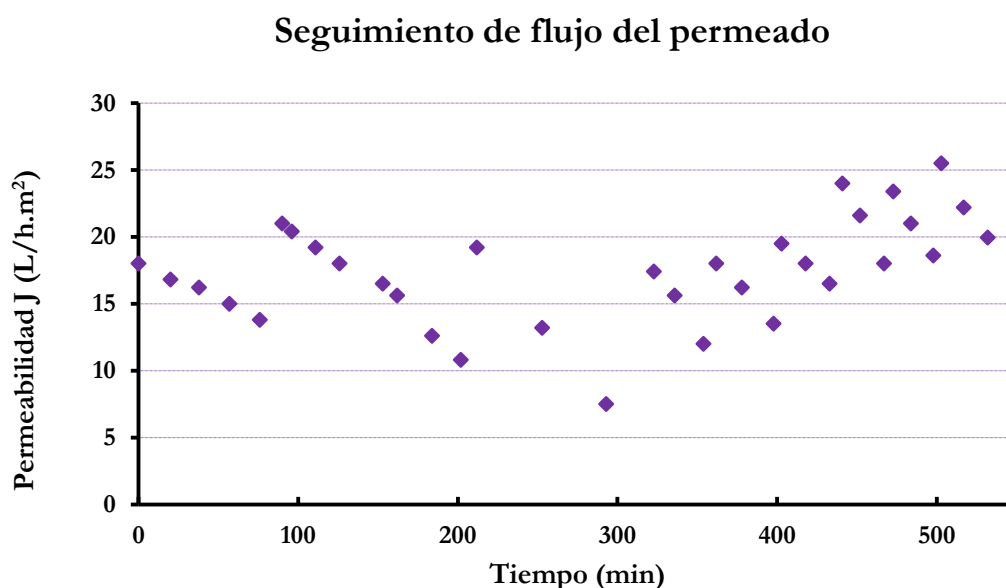


Figura 18. Membrana NanoMax-95. Seguimiento del flujo del permeado en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con reducción de volumen.

2.2.3. Seguimiento de la transferencia de materia

Sustancias totales solubles en agua (STSA)

En la figura 19 se puede ver el efecto del proceso de desalcoholización del vino VR-SD'08, sobre las STSA. Llama la atención que al principio de la diafiltración en el permeado pasaron un 1-1.5 % de STSA, mientras que con el transcurso del tratamiento, las STSA disminuyeron paulatinamente para alcanzar al final a valores en torno al 0.2 %, lo que señala que al final de la diafiltración quedaba un 13 % de las STSA, que permeaban al principio; en consecuencia, la diafiltración se había llevado a cabo bastante exhaustivamente. La disminución de la transferencia de STSA del 38 % al principio del tratamiento al 6.5 % en el ultimo concentrado/diafiltrado fue una primera indicación de que el proceso de desalcoholización sería satisfactorio. No hay que olvidar que el principal constituyente de las STSA del vino es el etanol.

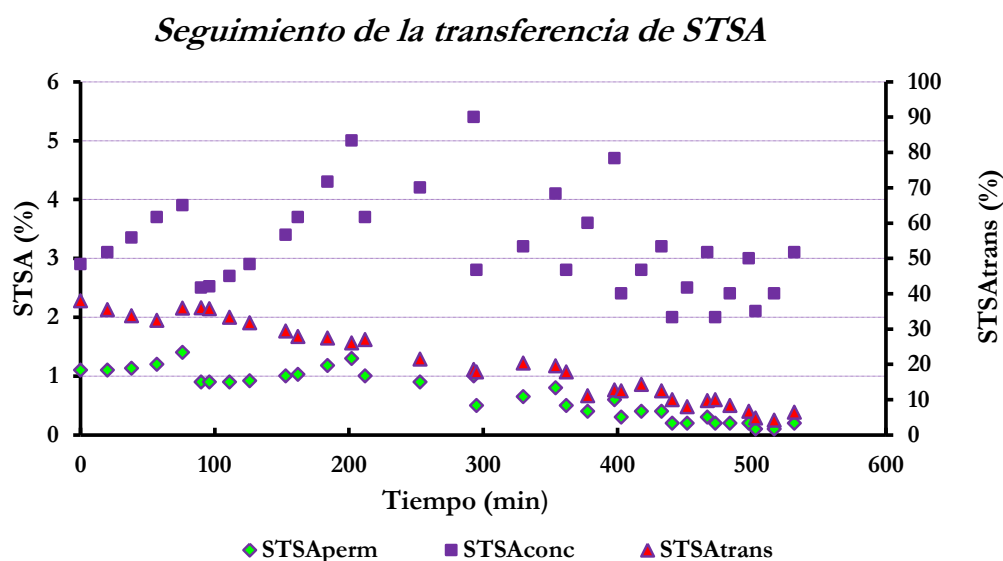


Figura 19. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la permeabilidad de los STSA flujo del permeado en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con reducción de volumen.

Por otro lado se pudo observar claramente la concentración de las STSA a lo largo de cada ciclo de concentración y su paulatina disminución a lo largo de la diafiltración, empezando con un 5 % en el primer concentrado (min 200) y terminando con un 3 % en el último concentrado/diafiltrado. Esta tendencia de disminución coincidía con la observada en el permeado, lo que indica que probablemente la mayor parte de las STSA que pasaron al permeado eran del etanol.

Contenido en etanol

En este tratamiento, la medida del contenido en etanol también era fundamental para la caracterización del proceso de desalcoholización. En la figura 20 se muestra la distribución del etanol en el permeado y el concentrado a lo largo de todo el tratamiento. En primer lugar se puede ver que la permeabilidad de la membrana al etanol, en las condiciones de desalcoholización con reducción del volumen, disminuyó del 57 (al inicio) al 32 % (al final del tratamiento), porcentaje superior al del tratamiento por diluciones secuenciales, con una media de 6-7 %. Por otro lado se

puede ver que al final del tratamiento se alcanzó un contenido en etanol del 1.26 % (v/v). Esto indica que al devolver el concentrado a su volumen inicial de 9 L, éste se quedaría con un contenido en etanol inferior al 0.63 %, nivel bastante menor del exigido para que sea admitido como bebida funcional. Este valor de desalcoholización puede tener dos significados importantes: por un lado, permite que el concentrado se diluya hasta un volumen inferior al inicial; es decir, que se puede quedar un poco más concentrado que el vino original, lo que tendrá una incidencia positiva en las propiedades sensoriales y funcionales del producto final. Por otro lado, indica que la diafiltración se podría haber parado en el séptimo ciclo, lo que supondría un ahorro importante de tiempo de más de 90 min, energía e incluso mejora en la calidad del producto final. Cabe destacar también que este método de diafiltración generó unos 49 L aprox. de aguas de diafiltración, 10 L menos que las aguas generadas en la diafiltración discontinua por diluciones secuenciales.

En la figura 20 se aprecia también cómo el contenido de etanol seguía una misma tendencia descendente, tanto en el permeado como en el concentrado, tendencia muy similar a la ya comentada de las STSA de la figura 19. Además se ve que el aumento del contenido en etanol, tanto en el permeado como en el concentrado, en cada ciclo era menos pronunciado, siendo más evidente en los primeros que en los últimos ciclos: 1.05 % (de 4.77 a 5.82 %) en el primero, frente a 0.07 % (de 0.33 a 0.4 %) en el último ciclo del permeado, y de 2.09 % (de 8.36 a 10.47 %) a 0.2 % (de 1.06 a 1.26 %) en el concentrado.

En ninguno de los dos tratamientos de ósmosis inversa se redujo el alcohol a niveles inferiores a 1, ya que requiere un gran esfuerzo alcanzar esas cantidades de etanol. En la desalcoholización de diferentes bebidas, Pilipovik y Riverol (2005) demostraron que una reducción de alcohol por debajo de 0.5 % era imposible en todos los casos.

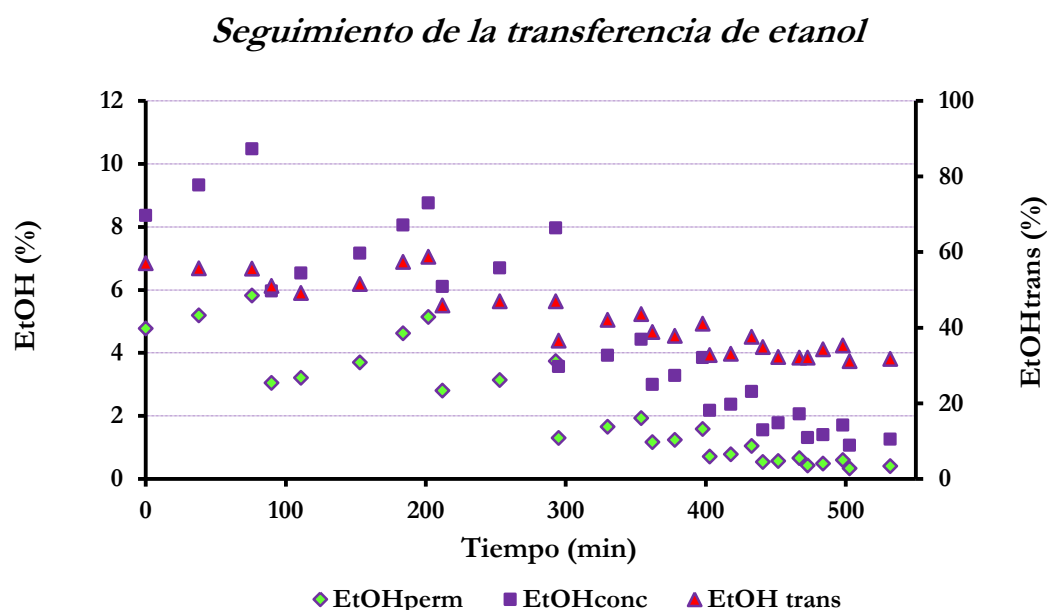


Figura 20. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia del etanol en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con reducción de volumen.

A pesar de no esperar de esta membrana una pérdida de ácidos orgánicos y sales, en este tratamiento se realizó un seguimiento de pH y conductividad eléctrica para comprobar el efecto de la desalcoholización sobre estos parámetros. Tales efectos se muestran en las figuras 21 y 22.

pH

Desde el comienzo hasta el final, el pH del permeado fue mayor que el del concentrado, y esta diferencia se mantuvo más o menos constante durante todo el proceso. Esta mayor acidez constante indicaba que al permeado pasaban, durante todo el proceso de diafiltración, sustancias de carácter ácido, como el ácido tartárico o el bitartrato potásico, que en el vino son bastante abundantes.

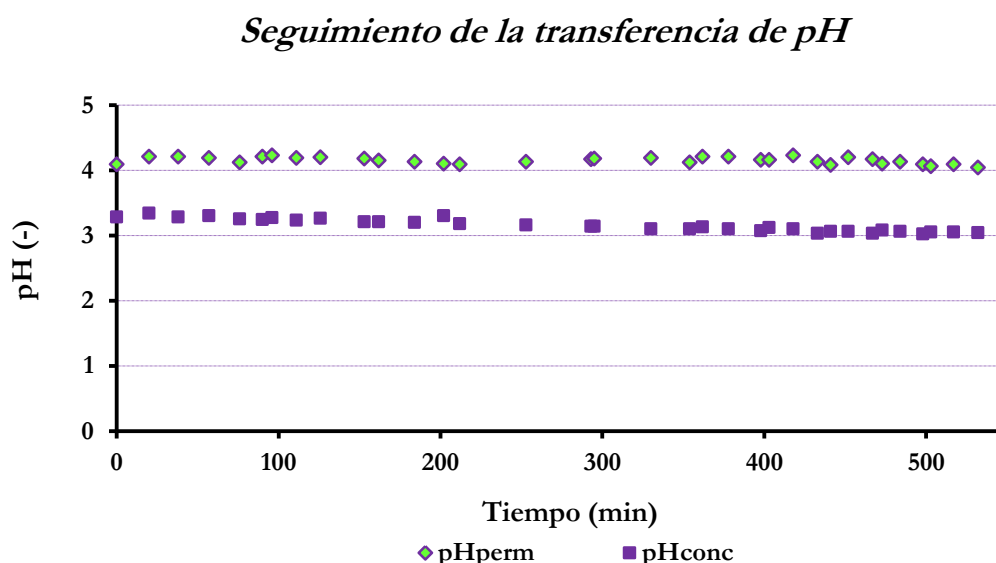


Figura 21. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia de pH en la desalcoholización de VR SD'08 por diafiltración discontinua con reducción de volumen.

Conductividad eléctrica (CE)

Los datos de conductividad eléctrica procedentes de las dos fracciones del vino durante el proceso de desalcoholización indicaron que la mayor parte de los electrolitos (sales) se quedaba retenida en el concentrado, mientras que sólo una parte muy pequeña, del 9-10 % inicial hasta un 4-5 %, en el séptimo ciclo de concentración/dilución, atravesaba la membrana (Figura 22). Esto significa que el propio proceso de diafiltración fue bastante eficiente, y tenía especial incidencia sobre las sales de muy baja masa molecular, sales que no se encontraban en el vino en cantidades importantes. Estos resultados indican con probabilidad que la mayor parte de los electrolitos que formaban parte del vino eran sales de mayor masa molecular, como pueden ser los ácidos tartárico, málico, cítrico, sulfatos o sulfitos, entre otros, y cuya composición probablemente no se encontraba alterada en el producto final.

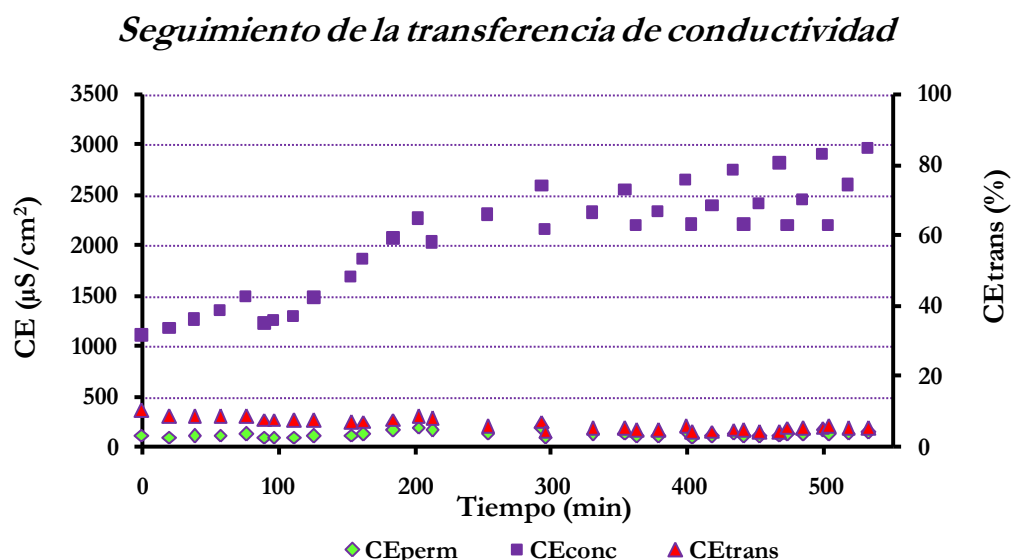


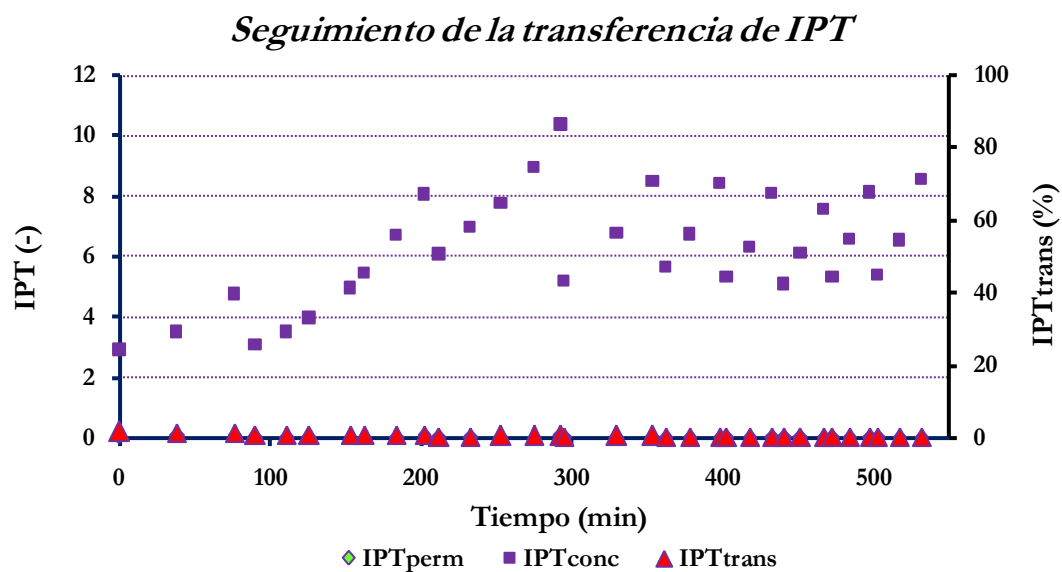
Figura 22. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia de conductividad eléctrica en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con reducción de volúmen.

Índice de polifenoles totales (IPT)

En lo que a la permeabilidad de los compuestos fenólicos (IPT) se refiere, los resultados analíticos fueron muy similares a los obtenidos para el modo de desalcoholización por diluciones secuenciales e indicaron que prácticamente todos estos compuestos se quedaron retenidos en el concentrado (Figura 23 a); únicamente una parte muy pequeña de estos compuestos, correspondientes a 0.05-0.02 unidades de IPT, atravesaron la membrana (Figura 23 b), lo que representaba menos del 2 % de retención en comparación con el vino de partida. Hay que destacar que dentro de estos bajos niveles de transferencia de compuestos fenólicos, la mayor parte de ésta sucedió en el periodo inicial del tratamiento, o los ciclos correspondientes a la desalcoholización por diluciones secuenciales.

Al final del tratamiento, el vino desalcoholizado se quedó con un IPT de 8.6, algo superior al del vino desalcoholizado por el modo de diluciones secuenciales (7.7), lo que indicaba que la diafiltración en modo reducción del volumen retenía mayor cantidad de compuestos fenólicos y por tanto garantizaba una mejor calidad del producto final.

A)



B)

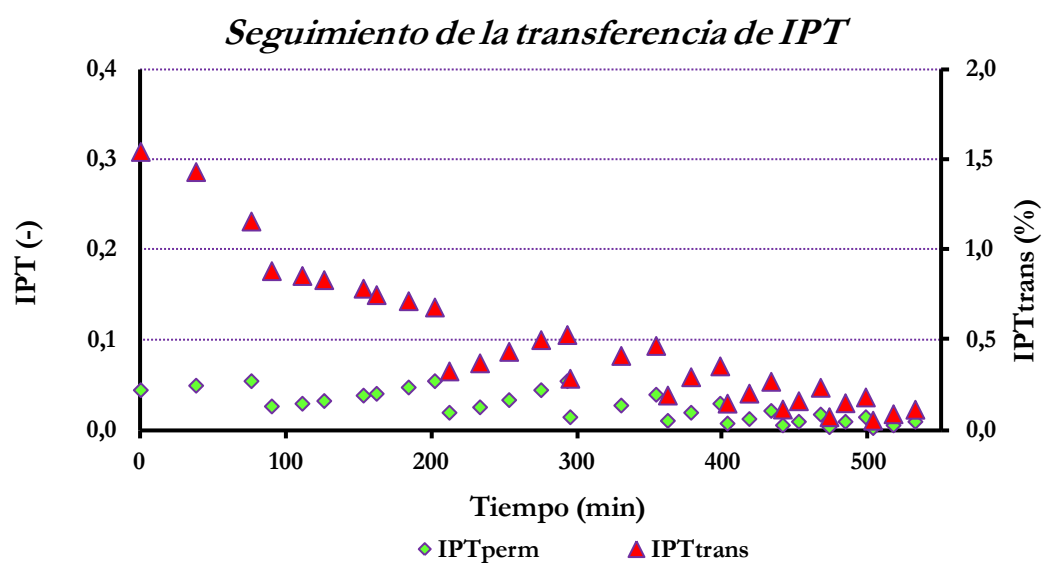


Figura 23. Membrana NanoMax-95. Seguimiento de la transferencia de compuestos que absorben a 280 nm, a) escala de 0-12 unidades de IPT, b) escala de 0.0-0.6 unidades de IPT, en la desalcoholización de VR-SD'08 por diafiltración discontinua con reducción de volumen.

3. DESALCOHOLIZACIÓN POR PROCEDIMIENTOS MIXTOS

En este caso, el proceso de desalcoholización se llevó a cabo en dos etapas. En la primera, el vino se desaromatizó con CO₂ supercrítico, y en la segunda, el vino desaromatizado se sometió a desalcoholización empleando tanto CO₂ supercrítico como OI, tal y como se describe a continuación:

3.1. Separación del aroma del vino rosado. Etapa 1

Esta etapa se realizó en primer lugar, y fue común para la posterior desalcoholización mediante los dos métodos estudiados.

La desaromatización del vino rosado se llevó a cabo con CO₂-SFE, a 40°C y 95 bar, el caudal de CO₂ se estableció en 0.9 kg/h y el del vino, en 0.25 L/h (relación CO₂/vino= 3.6). Durante la despresurización, el separador S1 se mantuvo a 50 bar, mientras que el S2 se despresurizó hasta 10 bar. La temperatura en ambos separadores se mantuvo a 35°C. Se alimentó la columna de extracción con un total de 12 L de vino. Se recuperaron 220 mL de extracto en el S1 y cantidades considerablemente menores en el S2. El balance de masas se cerró con una precisión mayor del 97 %.

El extracto obtenido en el S1 (18.3 mL/L vino rosado) fue completamente transparente y muy aromático (el cromatograma obtenido por MS-GC se muestra en la figura 24) y el refinado inodoro obtenido del fondo de la columna de extracción contenía 8.8 % (v/v) de etanol.

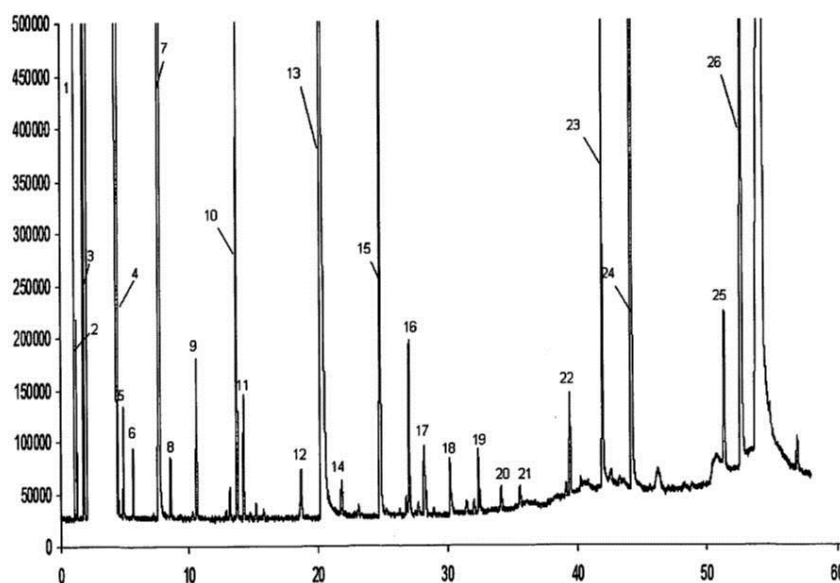


Figura 24. Cromatograma correspondiente al extracto recuperado del vino Rosado (separador S1). (1) Dióxido de carbono, (2) acetaldeído, (3) etil acetato, (4) 2-metil-1-propanol, (5) isoamil acetato, (6) n-butanol, (7) 3-metil-1-butanol, (8) etil-hexanoato, (9) 3-hidroxi-2-butanoato, (10) etil lactato, (11) 1-hexanol, (12) etil-octanoato, (13) ácido acético, (14) cis-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano, (15) 2,3-butanodiol, (16) ácido 2-metil-propanoico, (17) 2(3H)-dihidro-furanona, (18) ácido butírico, (19) dietil succinato, (20) 3-metil-mercapto-1-propanol, (21) metil-2-acetylhidroxi-palmitato, (22) ácido butanodioico, dietil éster, (23) ácido hexanoico, (24) fenil etil alcohol, (25) dietil hidroxibutanodiato y (26) ácido caprílico.

3.2. Desalcoholización. Etapa 2

3.2.1. Eliminación de etanol mediante SFE del refinado obtenido

La fracción líquida colectada del fondo de la columna de extracción en el paso 1 se utilizó para eliminar por completo el etanol remanente. De igual modo que en la desaromatización, la temperatura fue de 40°C y la presión de 95 bar. El separador S1 se mantuvo a 50 bar, mientras que el S2 se despresurizó hasta 10 bar. La temperatura en ambos separadores se mantuvo a 35°C.

En este caso, el caudal de CO₂ fue de 4.8 kg/h, y el de la muestra líquida fue de 0.20 L/h (relación CO₂/líquido=24). La concentración de etanol en el refinado obtenido en este caso (850 mL/L de vino rosado de partida) fue menor del 1 %.

3.2.2. Eliminación de etanol mediante OI del refinado obtenido.

Los resultados obtenidos con los dos métodos de desalcoholización por OI pusieron de manifiesto que la diafiltración discontinua con reducción de volumen combinada con las diluciones secuenciales al comienzo, era indudablemente más apropiada que la diafiltración con diluciones secuenciales, por lo que se emplearon esas condiciones establecidas para la desalcoholización por OI del vino desaromatizado.

10 L de vino rosado desaromatizado con CO₂ supercrítico en la etapa 1 fueron sometidos a un proceso de desalcoholización por diafiltración con agua desgasificada y sulfitada. La diafiltración se llevó a cabo a 8-10°C y 40 bar de presión, con la membrana Nanomax-95, en 2 ciclos de diluciones/concentraciones sucesivas (de 20 a 10 L) y en 7 ciclos de concentraciones/diluciones (de 10 a 5 L), con un volumen total de 55 L de agua (5.5 L agua/L vino desaromatizado) y tiempo total de casi 11 h. Se obtuvieron 5 L de vino diafiltrado (desaromatizado y desalcoholizado), para posteriormente ser diluido hasta su volumen inicial. Se retiraron 55 L de aguas de permeado.

3.3. Preparación del vino base para la elaboración de una bebida funcional

Se mezclaron 850 mL de cada uno de los vinos desalcoholizados (uno por SFE y otro por OI) con 18.3 mL del extracto aromático producido en el paso 1, obteniéndose 2 bebidas con un contenido en etanol del 1.1 y 2.7 % (v/v), respectivamente, que fueron analizadas sensorialmente, por un panel de cata semientrenado.

3.4. Análisis sensorial del vino desalcoholizado

Al análisis sensorial se sometieron los vinos obtenidos por:

- Desaromatización con CO₂ supercrítico (SFE) y desalcoholización posterior del vino desaromatizado por OI, al que después se le han añadido los aromas recuperados por SFE, en la cantidad correspondiente al vino original.
- Desaromatización y posterior desalcoholización del vino desaromatizado por SFE; también se le han añadido los aromas recuperados en la primera etapa por SFE en la cantidad correspondiente al vino original.

En ambos casos, se estableció una prueba añadiendo doble cantidad de aromas, sin tener en cuenta el contenido etanólico, con el único objeto de comprobar si se producía una mejora en cuanto a la calidad organoléptica de los vinos desalcoholizados.

El vino desaromatizado por SFE, desalcoholizado por **OI** y restituido con los aromas recuperados por SFE presentó un color típico de vino rosado de tonalidad cereza/rubí, limpio y de intensidad fuerte (pero notablemente inferior al del vino de partida). Mostró también una intensidad aromática media, con suave olor de vinaza, enmascarado por otros olores de tipo florales, especiados, vegetales y fenólicos. Se percibían notas ligeras de fruta dulce, anís, alcoholes amílicos y la sensación de irritación característica del SO₂; En general, presentó poca semejanza con el aroma de vino.

En cuanto al descriptor sabor, mostró un valor débil/medio de acidez, también con una nota débil de dulce, lo que le hacía mantener un sabor más parecido a un vino.

La variante con doble cantidad de aromas de esta experiencia de vino desalcoholizado no mejoró la calidad global del vino, es más, se reforzaron los olores amílicos.

El vino desaromatizado y desalcoholizado por **SFE** y restituido con los aromas recuperados por SFE presentó un color bastante intenso para un vino rosado (el mismo que el del vino de partida e incluso algo mayor) de tonalidad granate, limpio y de intensidad fuerte, es decir, el tratamiento tuvo más incidencias positivas que negativas sobre el color.

Mostró una intensidad aromática media/alta (mucho mayor que la del vino desalcoholizado por OI) y notablemente más agradable que la del vino de partida (conviene aclarar que el vino de partida, durante su almacenamiento, pudo haber desarrollado aromas desagradables (con evocaciones a humo, polvo, rancidez) y que el vino desalcoholizado no presentaba o lo hacía en menor proporción), aromas a fruta dulce (madura, higos) mucho más equilibrados y semejantes a un vino que los vinos de la experiencia anterior, y dejaban entrever ciertos aromas vegetales y ligeros aromas amílicos.

Presentó un sabor ácido débil (menos intenso que el del vino desalcoholizado por OI) con una leve nota dulce, lo que le hacía aún más equilibrado que el vino desalcoholizado por OI; se apreciaron notas muy ligeras de salado y amargo, así como cierta astringencia, dando la impresión de tener algo más de cuerpo que el vino anterior, apreciándose notas de vinaza.

La variante con más aromas de esta experiencia de vino desalcoholizado tampoco mejoró la calidad global del vino, reforzando igualmente los aromas amílicos. Éste fue el más parecido a un vino de los dos vinos desalcoholizados estudiados.

Comparando los vinos de los dos planteamientos de desalcoholización se aprecia una clara diferenciación entre el vino desalcoholizado por OI y el desalcoholizado por SFE, en favor de este último. La técnica de desalcoholización no tuvo ningún efecto negativo sobre el color del vino y mucho sobre el aroma y el sabor, a diferencia de lo que ocurría con el vino obtenido por OI; aumentó la tonalidad exterior, en comparación con el vino de partida, lo que podría deberse a una ligera disminución del pH ocasionada por el propio tratamiento por SFE (3.13 del vino de partida frente 3.01 del vino desaromatizado y desalcoholizado) o a una ligera concentración. Con respecto al aroma, resultó de especial interés el hecho de que quitando el alcohol del vino y devolviendo el aroma recuperado resultara un aroma frutal muy limpio y agradable (algo que estaba prácticamente ausente en el vino desalcoholizado por OI), que incluso podría superar al vino de partida, asumiendo que éste había evolucionado negativamente. En términos cuantitativos, la fracción aromática recuperada es suficiente por sí misma para compensar el aroma perdido, suponiendo que la recuperación real haya sido inferior al 100 %.

La reconstitución de los aromas del vino desaromatizado y desalcoholizado por SFE estableció un equilibrio aromáticamente correcto, siendo necesario matizar la acidez (siendo esta también menos intensa). Todo esto supuso mayores facilidades de reconstitución del vino desalcoholizado y posibilidad de lograr mayores calidades. Una vez determinado que la desalcoholización mediante SFE era la más adecuada, tanto por el grado alcohólico alcanzado (dentro de los límites establecidos para una bebida funcional), como por su calidad organoléptica, se analizó su composición aromática y capacidad antioxidante.

3.5. Análisis de aromas del vino rosado desalcoholizado por SFE

La bebida funcional (1.1 %, v/v etanol) a partir vino rosado contenía varios compuestos aromáticos detectados en el vino original, como se puede observar en los análisis GC-MS de la tabla 4. Algunas sustancias se presentaron en la misma concentración (3-metil-1-butanol, ácido acético, 2,3-butanodiol, ácido 2-metilpropanoico), aunque otras que se detectaron en el vino original, no lo hicieron en la bebida no alcohólica (etil acetato, 3-hidroxi-2-butanoato, etil lactato, cis-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano). Además, en la tabla 4 se resumen las áreas cromatográficas de los compuestos identificados en el vino rosado de partida y los obtenidos en el S1.

Tabla 4. Áreas cromatográficas obtenidas del vino rosado de partida, el extractos S1 del paso 1, el vino desalcoholizado del paso 2 y la bebida no alcohólica producida.

Compuesto	Vino rosado partida	Ext S1	Vino desalcoholizado	Bebida no alcohólica
Acetaldehído		119,166		
Etil acetato	194,430	2,894,893		
2-metil-1-propanol		2,144,850		
Isoamil acetato		257,327		
n-butanol		145,410		
3-metil-1-butanol	749,848	34,944,236		674,623
Etil hexanoato		172,957		
3-hidroxí-2-butanoato	47,548	561,970		
Etil lactato	56,900	2,053,307		
1-hexanol		474,860		
Etil octanoato		203,616		
2-furfural	309,200		249,722	210,090
Ácido acético	1,520,309	7,690,182	1,152,546	1,163,573
Cis-5-hidroxí-2-metil-1,3-dioxano	47,770	132,720	35,001	
2,3 butanodiol	3,206,841	4,511,741	3,580,614	3,493,937
5-metil furfural			134,611	
Ácido 2-metil propanoico	964,189	826,606	1,157,857	1,152,847
1,2-propanodiol			276,019	245,267
2-(3H)-dihidroxifuranona	102,998	288,085	97,772	64,033
Ácido butírico		322,514		
NI-I			25,156	
NI-II			84,553	
Ácido dietil ester butanodioico		510,897		
Ácido hexanoico		3,3254,559		
Fenil etil alcohol	168,806	9,062,757		106,534
NI-III				505,895
NI-IV				2,301,994
Dietil hidroxibutanodiato		804,047		
Ácido caprílico		6,615,062		
TOTAL	7,090,559	78,062,762	6,793,851	9,918,793

NI: compuesto no identificado

3.6. Determinación de actividad antioxidante

Como se muestra en la tabla 5, la eliminación de aromas del vino sólo causó pequeñas modificaciones en su actividad antioxidante y contenido de polifenoles. Los ensayos de DPPH mostraron un aumento muy pequeño en la capacidad antioxidante, según el aumento de polifenoles totales. Sin embargo, el valor ORAC fue ligeramente menor en el vino desalcoholizado desaromatizado, quizás debido a la diferencia existente en el mecanismo de acción entre ambos métodos (SET y HAT, respectivamente). La bebida funcional no alcohólica tuvo valores de DPPH, ORAC y polifenoles totales similares al vino de partida.

Tabla 5. Actividad antioxidante y contenido total de polifenoles en el vino rosado de partida, desalcoholizado y bebida no alcohólica

	DPPH (mmol Trolox/L)	ORAC (mmol Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
Vino de partida	1.499 ± 0.020 ^b	17.290 ± 0.593 ^b	429.860 ± 14.801 ^b
Vino desalcoholizado	1.666 ± 0.140 ^a	15.611 ± 0.550 ^a	444.513 ± 11.841 ^a
Bebida no alcohólica	1.542 ± 0.042 ^c	16.653 ± 0.834 ^b	423.587 ± 12.617 ^b

^{a, b, c} letras diferentes indican diferencias significativas mediante el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tanto los valores de polifenoles totales determinados por Folin Cicalteau como los de actividad antioxidante obtenidos mediante los métodos de DPPH y ORAC se encuentran dentro del rango obtenido por Bogianchini y col. (2011) para los vinos rosados desalcoholizados. A su vez, estos autores determinaron que el tiempo de almacenamiento de estas botellas, influía en el contenido de compuestos fenólicos y en su actividad antioxidante; por tanto, sería de especial interés que el etiquetado reflejase la fecha óptima de consumo, si lo que se busca para el consumidor es una bebida con propiedades antioxidantes.

ANEXO

1. FICHA DE CATA. AROMAS

CATADOR:

FECHA:**SERIE:**

Nº DE MUESTRA:

EXAMEN	DESCRIPTORES	1 MUY DÉBIL	2 DÉBIL	3 MEDIO	4 FUERTE	5 MUY FUERTE
AROMA NASAL	VÍA INTENSIDAD GLOBAL					
	AFRUTADOS					
	FLORALES					
	ESPECIADOS					
	VEGETALES					
	FENÓLICOS					
	MADERA					
	MICROBIOLÓGICOS					
	OXIDACIÓN					
	QUÍMICOS					
	ALTERACIÓN					
AROMAS DOMINANTES:						

Nivel de similitud con el vino:

Muy diferente Muy similar

Observaciones eventuales:

CAPÍTULO 3.
Materias primas: Lúpulo. Obtención
de extractos de prenilflavonoides

OBJETIVO

La segunda hipótesis del presente trabajo de Tesis Doctoral considera que los polifenoles son responsables mayoritarios del efecto cardiosaludable del vino, aunque su tipo y concentración no sean suficientes para obtener efectos claramente sensibles y por tanto concluyentes. Por ello, uno de los objetivos específicos es estudiar procedimientos de obtención de extractos de lúpulo ricos en polifenoles complementarios a los que contiene el vino.

La obtención de extractos de lúpulo responde al mencionado objetivo. Se orienta al enriquecimiento del vino en isoxanthohumol, por extracción del mismo o mediante transformación de xanthohumol a partir de materia prima vegetal con alto contenido en isoxanthohumol y/o xanthohumol, en particular a partir de variedades de lúpulo (*Humulus lupulus*).

El objetivo concreto de esta parte del trabajo consiste en evaluar las condiciones más adecuadas de obtención de extractos de lúpulo con la composición de interés.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades curativas del lúpulo son conocidas desde hace muchos años en la medicina tradicional. Además, como se ha dicho, está ampliamente extendido como agente saborizante y estabilizante en la industria cervecera (Helma y col., 2007).

El lúpulo es muy rico de prenilflavonoides que son secretados junto con ácidos amargos y aceites esenciales por las glándulas de las inflorescencias. El principal prenilflavonoide del lúpulo es el xanthohumol (XN) (Magalhães y col., 2008), y en base a sus propiedades saludables sería interesante la producción de una bebida enriquecida en esta sustancia. Sin embargo, no se han encontrado métodos eficientes de extracción de isoxanthohumol o de 8-prenilnaringenina (8-PN), flavonoides presentes en el lúpulo, y a los que se atribuyen efectos protectores del metabolismo celular. El IX es precursor de la 8-PN, de ahí el interés de obtener extractos ricos en el primero.

En consecuencia, dada la ausencia de métodos de extracción de IX a partir del lúpulo, en este trabajo se planteó como objetivo el desarrollo de un proceso que permitiera una extracción selectiva y eficaz de IX; para ello se estudió la extracción con agua subcrítica y se comparó con una extracción sólido-líquido convencional, como técnica de referencia.

Extracción presurizada de líquidos (PLE)

La característica fundamental de la PLE radica en el empleo de disolventes a elevadas temperaturas y una presión suficiente para mantener el estado líquido; por tanto, posee las ventajas de trabajar con un líquido a elevadas temperaturas: tal es el caso del aumento de solubilidad y la mejora de las propiedades de difusión y transporte. Teniendo en cuenta que los compuestos a extraer deben tener una aplicación como ingredientes alimentarios funcionales, el interés de este trabajo se centró en el empleo de disolventes medioambientalmente seguros.

De entre todos los disolventes existentes, el agua es el más inocuo, económico, disponible y medioambientalmente seguro, por tanto, se puede considerar como el

disolvente ideal. El mayor inconveniente del agua es su elevada polaridad, que favorece la extracción de compuestos de naturaleza polar. Sin embargo, en la región subcrítica (SWE, Subcritical Water Extraction) el agua posee unas propiedades muy interesantes que la hacen apta para la extracción de compuestos de naturaleza medianamente polar; en este sentido, al incrementar su temperatura disminuye su constante dieléctrica (directamente relacionada con el grado de polaridad) y por tanto, aumenta su carácter apolar; en definitiva, la polaridad o apolaridad del agua puede modificarse sustancialmente mediante un cambio en su temperatura, pudiendo oscilar entre una constante dieléctrica desde 80 (a 25°C) hasta 25 (a 250°C).

Por este motivo el agua ha sido el disolvente seleccionado para llevar a cabo el desarrollo del proceso en el que se basa el presente capítulo. Asimismo, y con el objetivo de mejorar la selectividad del proceso, se ha desarrollado un nuevo método basado en la extracción presurizada de líquidos (PLE) empleando como disolventes hexano, etanol y agua de forma secuencial.

La principal ventaja del procedimiento empleado frente a los procesos de extracción convencionales, de síntesis química, o de extracción de xanthohumol y transformación en isoxanthohumol utilizados hasta el momento radica, precisamente, en el desarrollo de un proceso de obtención de extractos enriquecidos en isoxanthohumol, frente al xanthohumol como prenilflavonoide mayoritario del lúpulo.

Los extractos vegetales, obtenidos mediante el presente procedimiento, tienen la ventaja de poder ser utilizados directamente en la formulación de distintos tipos de alimentos enriquecidos sin aportar ningún tipo de residuo de disolventes químicos al alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Lúpulo granulado, pelletizado y envasado al vacío, suministrado por S.A. Española de Fomento de Lúpulo (Villanueva de Carrizo, León). Los pellets de lúpulo se molieron con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica

2. REACTIVOS

- Dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo y metanol, de LAB-SCAN Analytical Sciences (Polonia).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, Na_2CO_3 y arena de mar, de Panreac Química Sau (Barcelona).
- Ácido fórmico, de Fluka Analytical (Alemania)
- Xanthohumol e Isoxanthohumol, de Sigma-Aldrich (St Louis, EEUU).
- Agua Milli Q se obtuvo mediante un sistema de purificación integral de agua Milli Q de Millipore de Billerica (Massachusetts, Estados Unidos).
- Nitrógeno líquido, de Air Liquide España S.A. (Madrid)

3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

3.1. Extracción sólido-líquido a temperatura ambiente y presión atmosférica

Se utilizó como método de control para determinar el contenido total de IX y XN en el lúpulo. El procedimiento de extracción utilizado fue el siguiente:

En un vaso de precipitados se introdujo 1 g de lúpulo molido junto con 40 ml de DMSO y se dejó agitando en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo se filtró el contenido del matraz con papel de filtro y se recogió tanto el filtrado como el sólido retenido. Con este sólido se repitió el mismo tratamiento (ciclo de extracción) hasta agotar los componentes de interés en la muestra, guardando los filtrados de cada ciclo de extracción protegido de la luz.

3.2. Extracción sólido-líquido en condiciones subcríticas

Para llevar a cabo las extracciones de lúpulo se ha utilizado el sistema de PLE ASE 200 (Accelerated Solvent Extraction system), de Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA). La celda de extracción utilizada fue de 11 mL de capacidad.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio preliminar de optimización del método en el que, partiendo de lúpulo granulado, se realizaron extracciones de 6 ciclos de 5 min cada uno, a una presión de 1500 psi (106,85 bar aprox.) a diferentes temperaturas: 50°C, 100°C, 150°C y 200°C. Una vez obtenidas las muestras se liofilizaron. Por su parte, optimizada la temperatura de extracción (150°C) se estudiaron dos aproximaciones:

- Extracción individual: la muestra se sometió a una extracción con etanol de 6 ciclos de 5 min cada uno, para comparar con la extracción acuosa.
- Extracción secuencial: la misma muestra de lúpulo se sometió a tres ciclos de extracción seguidos, con diferentes disolventes, en orden creciente de polaridad: hexano, etanol y finalmente agua, a la temperatura óptima y presión de 1500 psi, durante 20 min cada uno.

El procedimiento de extracción fue el mismo para todas las muestras de lúpulo, independientemente de las condiciones concretas de extracción utilizadas en cada caso: se molieron los pellets de lúpulo con nitrógeno líquido, y el polvo resultante se introdujo en la celda de extracción junto con arena de mar, en una proporción de 1:2 (p/p) con el fin de impedir la agregación y empaquetamiento del material vegetal durante el proceso de extracción. La celda con ambos materiales, se agitó con el fin de obtener una mezcla lo más homogénea posible. Una vez introducida la celda en el equipo ASE 200 se llenó de disolvente y se aumentó la presión hasta alcanzar 1500 psi. A continuación se pasó a la fase de calentamiento hasta alcanzar las condiciones de temperatura del interior de la celda de extracción. El tiempo hasta lograr dicha temperatura, denominado “heat-up time”, es específico para cada temperatura y viene definido por el sistema. En este caso, el tiempo de calentamiento fue de 7 min para alcanzar los 150°C. Una vez superados los 7 min se inició la extracción en modo estático. Transcurrido el tiempo de extracción, el disolvente se expulsó de la celda con N₂ y se recogió en un vial.

En los extractos acuosos, el agua se eliminó mediante un liofilizador Freeze Dry System, Model 79480 (Labconco Corporation, Missouri, EEUU) a 4°C.

Para eliminar el disolvente orgánico se utilizó un Rotavapor R-210 (de Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Una vez obtenidos los extractos en fase sólida se guardaron a 4°C en ausencia de luz.

4. MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS

4.1. HPLC-PAD

Los extractos acuosos obtenidos en condiciones subcríticas a diferentes temperaturas (50°C, 100°C, 150°C y 200°C) se analizaron según el siguiente método (Bernal y col., 2011):

- Sistema cromatográfico empleado para el análisis: HPLC, serie 1100, de Agilent Technologies (Palo Alto, California, EEUU), compuesto por una bomba cuaternaria, un degasificador en línea, un inyector automático, un termostatizador externo de la columna cromatográfica y un detector de fotodiodos alineados (PAD) conectados a una estación de tratamiento de datos Chemstation.
- Condiciones cromatográficas:
 - Fase estacionaria: Columna Spherisorb ODS2, 80 Å de tamaño de poro, 5 µm de tamaño de partícula, y de dimensiones 250 x 4.0 mm de Waters (Milford, Massachusetts, EEUU)
 - Fase móvil compuesta por:
 - Componente A (C. A): Acetonitrilo/Ácido acético (99/1)
 - Componente B (C. B): Agua/Ácido acético (99/1)
 - Componente C (C. C): Metanol/Ácido acético (99/1)
 - Muestra: se disolvió en DMSO (10 mg/mL)
 - Volumen de inyección: 20 µL
 - PDA: 280 nm para XN y 370 para IX y 8-PN
 - Temperatura de la columna: 25°C
 - Flujo: 1 mL/min

- Condiciones de elución:

Tiempo (min)	C. A (%)	C. B (%)	C. C (%)
0	56	44	0
10	44	51	5
12	56	44	0
17	56	44	0

4.2. UHPLC-PAD-ESI-MS/MS

Los extractos obtenidos mediante condiciones subcríticas utilizando agua y etanol a 150°C, y los extractos secuenciales con hexano, etanol y agua, se analizaron empleando un método adaptado de Bernal y col. (2011):

- Sistema de cromatografía líquida U-HPLC en modo HPLC (Accela de Thermo Electron Corporation, San José, California, EEUU) compuesto por una bomba cuaternaria, un muestreador automático, un horno de termostatación y un detector de fotodiodos alineados (PAD), conectados a una estación de tratamiento de datos Excalibur.
- Para una identificación más objetiva de los compuestos de interés, dicho U-HPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS) (TSQ-Quantum de Thermo Electron Corporation, San José, California, EEUU) con una interfase de ESI (Figura 1).

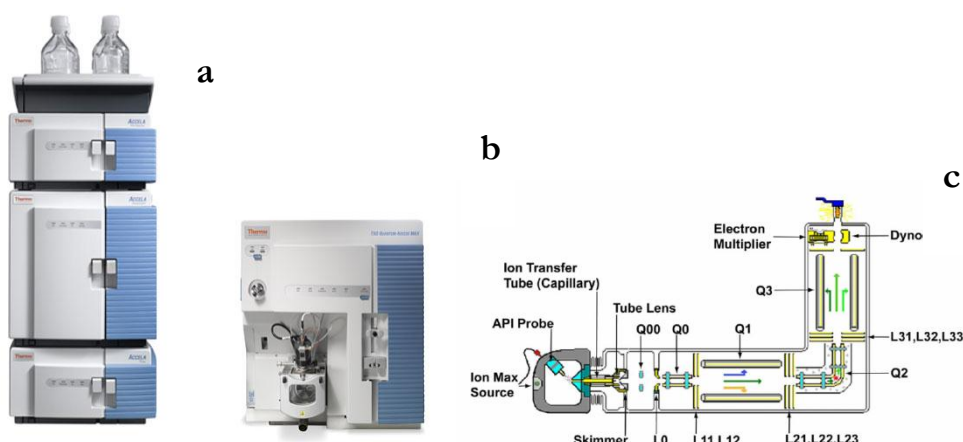


Figura 1. Equipos utilizados para este método, U-HPLC (a) y MS (b). Esquema de las partes de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (c).

- Condiciones cromatográficas:
 - Fase estacionaria: Columna ACE 3 C18-AR, de 3 µm de tamaño de partícula, y de dimensiones 150 x 4.6 mm (Advances Chromatography Technologies, Aberdeen, Reino Unido).
 - Fase móvil compuesta por:
 - Componente A (C. A): Acetonitrilo/Ácido fórmico (99/1)
 - Componente B (C. B): Metanol/Ácido fórmico (99/1)
 - Componente C (C. C): Agua/Ácido fórmico (99/1)
 - Componente D (C. D): Metanol
 - Muestra: se disolvió en DMSO (2.5 mg/mL)
 - Volumen de inyección: 20 µL
 - PDA: 280 nm para XN y 370 para IX y 8-PN
 - Temperatura de la columna: 25°C
 - Flujo: 0.6 mL/min
- Condiciones de elución:

Tiempo (min)	C. A (%)	C. B (%)	C. C (%)	C. D (%)
0	56	0	44	0
8	51	5	44	0
10	51	5	44	0
17	95	5	0	0
22	95	0	0	5
26	80	0	0	20
27	56	0	44	0
32	56	0	44	0

- Condiciones de análisis del detector de MS:
 - **Método de ionización:** la fuente de ionización es de tipo ESI (ionización por electrospray). La elección de este tipo de ionización se debió principalmente a dos razones, la primera de ellas obedeció a la escasa polaridad de los prenilflavonoides y la segunda se centró en la masa molecular de estos compuestos (alrededor de unos 350 *m/z*).

Se aplicaron los dos modos de polarización (positivo y negativo) de forma simultánea. Las condiciones para ambos fueron similares con excepción de la tensión eléctrica del spray (positiva: 3000 V y negativa 4500 V).

- **Método de análisis de MS:** se llevó a cabo en dos fases:
 - La primera abarcó desde el minuto 0 al 15.8, y se utilizaron dos filtros masas-masas y dos “full scan” o escáners completos; los “full scan” corresponden a las ionizaciones positiva y negativa; uno de los filtros dejó pasar únicamente compuestos cuya masa correspondía a la del Xanthohumol (o Isoxanthohumol puesto que su masa es la misma), es decir 355.4 m/z con los dos iones fragmentos mayoritarios de 299 y 179 m/z y el otro filtro sólo dejó pasar compuestos cuya masa correspondía a la de la 8-Prenilnaringenina, es decir, 341.4 m/z con los dos iones fragmentos mayoritarios: 336 y 338 m/z . La elección de los dos iones fragmentos se hizo siguiendo las pautas de la Unión Europea (Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002) mediante búsqueda asistida por ordenador tras la infusión de los compuestos estándar.
 - La segunda fase comprendió desde el minuto 15.8 hasta el final del análisis (minuto 28) y se utilizaron tres filtros masas-masas. Un “full scan” en positivo, y otro “full scan” en negativo con fragmentación en fuente con un voltaje de 30 V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La bibliografía describe relaciones de XN:IX de 22:1 para muestras vegetales de lúpulo extraídas con etanol, de 77:1 en el caso de extracciones realizadas con ácido fórmico y metanol, o de 7: 1 para extracciones con CO₂ supercrítico (Magalhães y col., 2007). Por tanto, conforme a lo descrito en la bibliografía, se espera encontrar una proporción mayor de xanthohumol que de isoxanthohumol en el material original (lúpulo pelletizado). Respecto al contenido de 8-prenilnaringenina, la bibliografía describe que puede encontrarse en pequeñas cantidades, aunque en ocasiones no es posible detectarla (Zanoli y Zavatti, 2008).

1. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO A TEMPERATURA AMBIENTE Y PRESIÓN ATMOSFÉRICA

El método de extracción sólido-líquido se realizó con el objetivo general de estimar el contenido en xanthohumol e isoxanthohumol en el material vegetal utilizado, cuyos resultados servirían también como referencia para los del método de extracción en condiciones subcríticas.

Los resultados procedentes de los análisis realizados con extractos de lúpulo según el método analítico por UHPLC, se muestran en la figura 2:

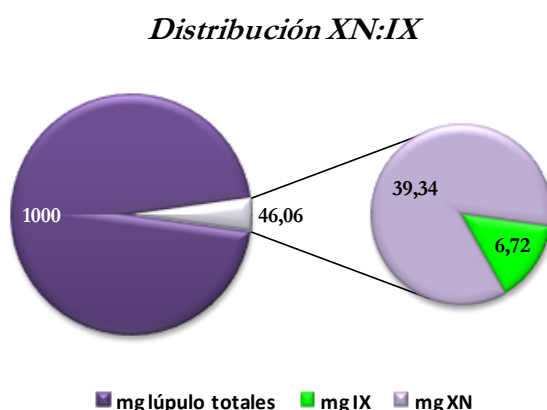


Figura 2. Contenido de XN e IX en miligramos por gramo de lúpulo obtenidos mediante la extracción sólido líquido, a temperatura ambiente y presión atmosférica.

La proporción de xanthohumol:isoxanthohumol obtenida fue de 6:1, aproximadamente, con un rendimiento medio de 3.93 y 0.67 mg/g lúpulo respectivamente, lo que se asemejaría bastante a las proporciones encontradas por diversos autores mediante otros procedimientos (Magalhaes y col., 2007; Kac y col., 2007).

2. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO EN CONDICIONES SUBCRÍTICAS

Aunque el empleo de DMSO como disolvente de extracción tiene gran utilidad desde un punto de vista analítico, puesto que permite extraer la casi totalidad de los flavonoides, la dificultad que conlleva su eliminación desaconseja su uso en procesos de extracción industriales. Por tanto, en este capítulo se ha estudiado el empleo de disolventes más limpios y seguros (agua, etanol) y de procesos que permitan mejorar la eficacia y selectividad de la extracción. Para ello, tal y como se ha comentado previamente, se desarrollaron varios métodos basados en el empleo de PLE (en su modalidad de extracción con agua: SWE) para la extracción y fraccionamiento de prenilflavonoides del lúpulo.

Para optimizar la extracción de la muestra triturada de lúpulo con agua subcrítica, se ensayaron cuatro temperaturas de extracción: 50°C, 100°C, 150°C y 200°C. En la tabla 1 se muestran los resultados de los rendimientos obtenidos con cada una de las temperaturas aplicadas, así como el factor de concentración de la cantidad total de XN, IX y 8-PN.

Tabla 1. Rendimientos de extracción (%) de lúpulo en agua bajo condiciones subcríticas a diferentes temperaturas.

Temperatura de extracción (°C)	Rendimiento (%)	Factor de concentración *
50	20.03	1.00
100	22.10	9.81
150	33.50	30.85
200	31.64	30.24

*Respecto de la extracción a 50°C

Como se puede comprobar en esta tabla, los mayores rendimientos de extracción se correspondieron con las temperaturas más elevadas (150°C y 200°C), presentando la de 150°C rendimientos algo superiores a la de 200°C (33.50 y 31.64 %, respectivamente). En estos casos fue notable el papel de la presión, ya que a temperaturas por debajo de 100°C, el disolvente permanece en estado líquido, mientras que para temperaturas superiores, la presión debe ser lo suficientemente elevada como para que el disolvente, en este caso agua, se mantenga en estado líquido.

Tanto a 150°C como a 200°C, la cantidad de prenilflavonoides se triplicó respecto al extracto sometido a 100°C, siendo 30 veces mayores si se comparan con aquellos obtenidos a 50°C.

Otro motivo por el que las temperaturas más elevadas resultan más adecuadas que las de 50°C y 100°C sería la selectividad: mientras que el XN se detectó a todas las temperaturas probadas (aunque la señal fue mayor cuanto más se incrementaba la temperatura), el IX sólo se detectó a 150°C y 200°C (Figura 3).

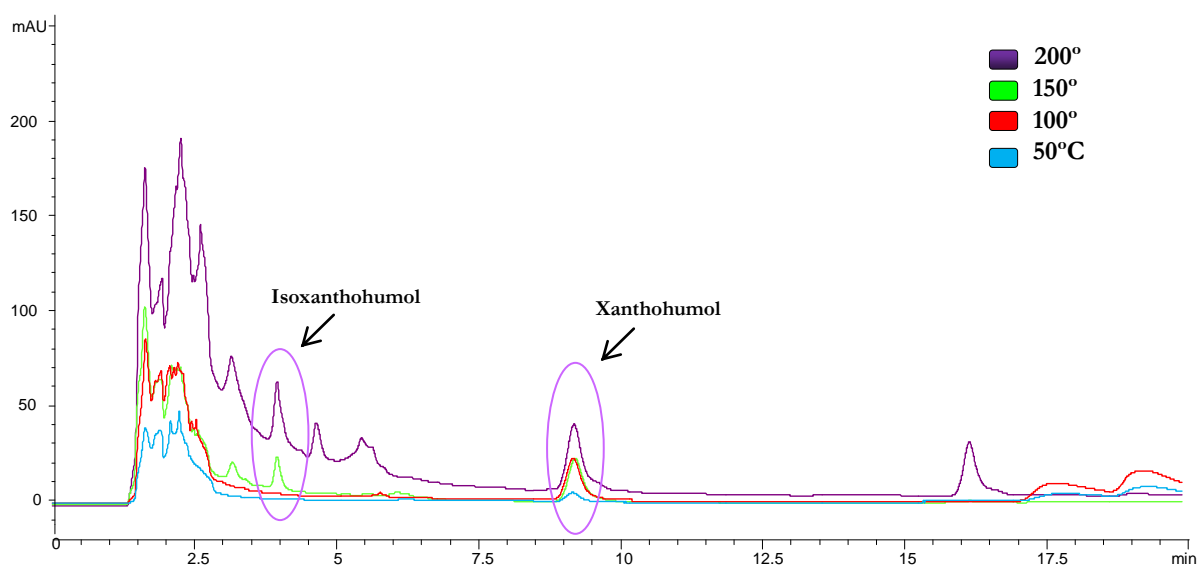


Figura 3. Cromatogramas de extractos obtenidos con agua presurizada a 50, 100, 150 y 200°C, a 370 nm, según el método de análisis descrito por Bernal y col., 2011.

En principio, ambas temperaturas (150°C y 200°C), serían adecuadas para la extracción de los prenilflavonoides de interés, pero la extracción a 200°C presentó el inconveniente técnico de la colmatación del filtro de la celda. Debido a esta dificultad, se eligió la temperatura de 150°C.

Sin embargo, como a 150°C, algunos compuestos (ej. min 15.7) tuvieron muy baja respuesta analítica (absorbancia a 280 y 370 nm) para su análisis se utilizó un segundo método con mayor sensibilidad de detección: UHPLC-PAD-ESI-MS/MS. Para la identificación de los picos sin patrón de referencia se utilizó un analizador de masas de triple cuadrupolo. Mediante infusión directa en el TSQ-Quantum (ionizador ESI-analizador de triple cuadrupolo) se optimizó la ionización y el filtrado de masas para el xanthohumol y el isoxanthohumol.

Los resultados obtenidos con el contenido de IX y XN de los diferentes extractos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido de IX y XN, relación de IX / XN, y rendimiento de los extractos obtenidos utilizando diferentes disolventes en condiciones subcríticas. Agua 150° (extracción individual presurizada con agua como disolvente), Etanol 150°C (extracción individual presurizada con etanol como disolvente), Fr-Hexano (Extracción presurizada en secuencia con hexano como disolvente), Fr-Etanol (Extracción presurizada en secuencia con etanol como disolvente), Fr-Agua (Extracción presurizada en secuencia con agua como disolvente)

Tipo Extr.	Compuesto	mg compuesto/ g lúpulo	mg compuesto/ g extracto	Relación IX/XN (extracto)	Rendimiento extracto (%)
Agua 150°	IX	0.86 ± 0.24	2.34 ± 0.75	21	33.98
	XN	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.03		
Etanol 150°	IX	0.37 ± 0.02	0.67 ± 0.10	0.35	53.06
	XN	1.06 ± 0.09	1.89 ± 0.00		
Fr-Hexano	IX	0.023 ± 0.01	0.074 ± 0.04	0.20	26.6
	XN	0.09 ± 0.04	0.35 ± 0.15		
Fr-Etanol	IX	0.71 ± 0.12	5.15 ± 1.10	2	13.79
	XN	0.35 ± 0.05	2.57 ± 0.33		
Fr-Agua	IX	0.018 ± 0.07	0.14 ± 0.07	14	13.37
	XN	0.002 ± 0.001	0.01 ± 0.008		

2.1. Análisis del extracto individual con agua como disolvente

Se realizaron varias extracciones en condiciones subcríticas, a 150°C, con agua como disolvente, y posteriormente los extractos se analizaron con el método de UHPLC-MS/MS.

Los cromatogramas correspondientes a los extractos se muestran en la figura 4:

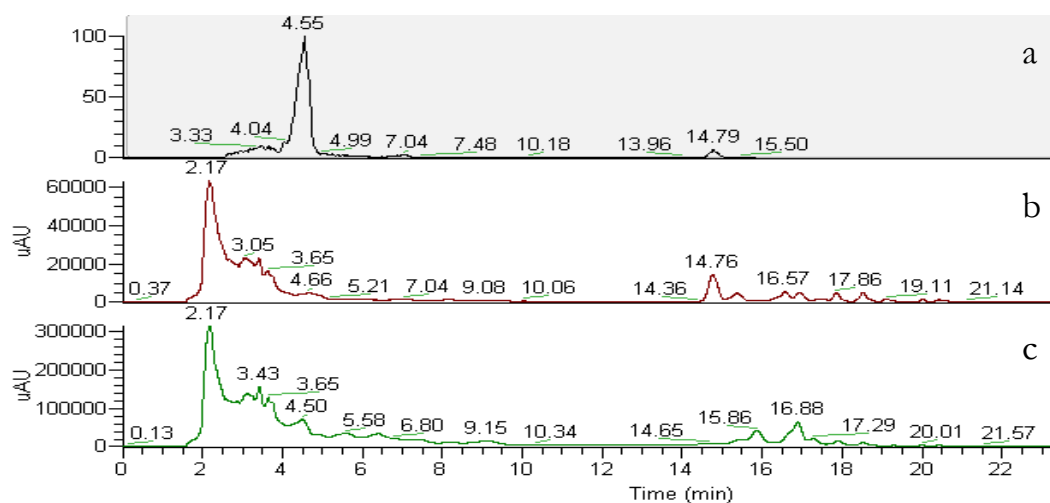


Figura 4. Extracto de la corriente iónica a 355.4 m/z (a) y cromatogramas obtenidos de la muestra extraída con agua a 150°C a 370 nm (b) y a 280 nm (c).

La figura 4a muestra los resultados recogidos tras el uso del filtro de 355.4 m/z , masa correspondiente al xanthohumol e isoxanthohumol; los picos que se observan corresponden al xanthohumol (cuyo tiempo de retención es de 14.79 min) y al isoxanthohumol (con un tiempo de retención de 4.55 min). Ambos compuestos están presentes en dicha muestra y, a primera vista, se puede afirmar que el área del pico de isoxanthohumol es mucho mayor que el de xanthohumol, es decir, un mayor contenido del primero con respecto al segundo en las muestras analizadas. Utilizando la extracción de DMSO como control, se puede observar que, el material obtenido tras ambos procesos de extracción, ofrece diferentes proporciones de xanthohumol e isoxanthohumol para los dos procesos de extracción.

Tras la cuantificación de los picos identificados se obtuvieron los siguientes resultados: 2.34 mg IX/g de extracto (0.86 mg/g de lúpulo) y 0.11 mg/g de extracto (0.04 mg XN/g de lúpulo). La relación IX/XN aumentó de 0.17 en el lúpulo (extracción con DMSO) a 21 en el extracto. Estos datos demostraron la existencia de selectividad para el XN.

2.2. Análisis del extracto individual con etanol como disolvente

Para comparar los resultados obtenidos con otros disolventes, se realizaron varias extracciones utilizando etanol en condiciones subcríticas.

Como se muestra en la figura 5a, el área del pico del XN es mucho mayor que la del IX, algo similar a lo que sucedía con los extractos de sólido-líquido. En los cromatogramas b y c también se encuentran los picos de IX y XN, pero no tan claramente diferenciados. Además, a partir del minuto 16, se detectaron otros compuestos que, aparentemente, se correspondían con las diferentes formas de humulonas y lupulonas (α y β -ácidos), lo que se debe a la baja selectividad del etanol como disolvente.

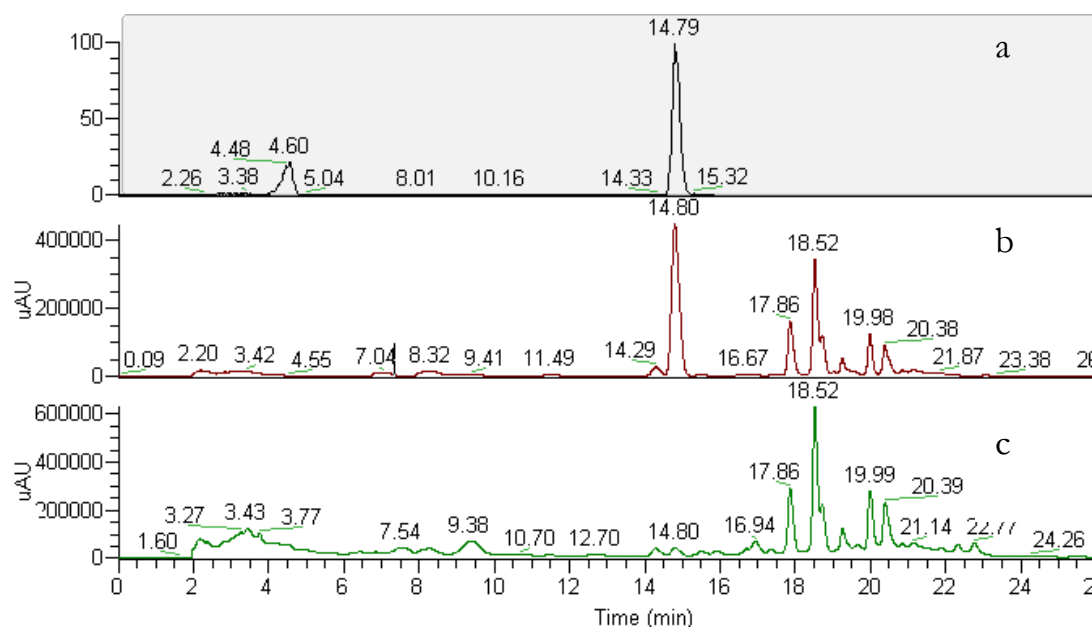


Figura 5. Extracto de la corriente iónica a 355.4 m/z (a) y cromatogramas obtenidos de la muestra extraída con etanol a 150°C a 370 nm (b) y a 280 nm (c).

Se obtuvieron 0.67 mg IX/g extracto (0.37 mg/g lúpulo) y 1.89 mg XN/g extracto (1.06 mg/g lúpulo) (Tabla 2). En este caso, la relación IX/XN sería de 0.35, lo que confirma que el etanol no es muy selectivo bajo estas condiciones. Sería más parecido a la relación IX/XN del extracto realizado con DMSO (0.17). Se obtendría casi el triple de XN que de IX, pero aún así, pensando en la utilidad de obtener XN como extracto, habría unas 30 veces menor concentración que en extractos etanólicos comerciales de lúpulo (Magalhaes y col., 2007).

2.3. Análisis de la extracción secuencial

Se realizaron varias extracciones secuenciales para intentar aumentar la selectividad de la extracción, con diferentes disolventes, en orden creciente de polaridad: hexano-etanol-agua, como se describe en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos.

2.3.1. Extracción con hexano

En la figura 6, se pueden observar los cromatogramas de la primera fracción del extracto obtenido con hexano como disolvente:

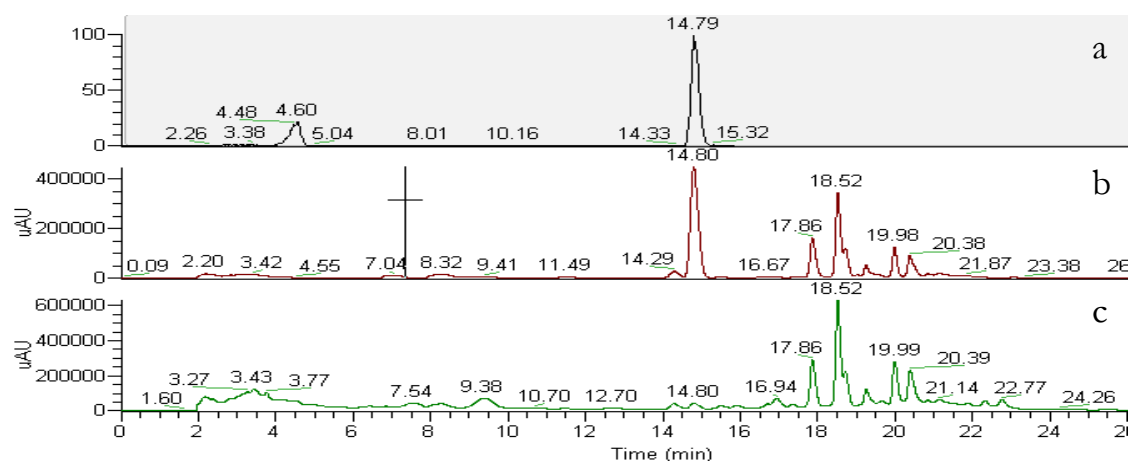


Figura 6. Extracto de la corriente iónica a 355.4 m/z (a) y cromatogramas de la muestra extraída con hexano mediante la extracción secuencial a 150°C a 370 nm (b) y a 280 nm (c).

En el cromatograma con el filtro de 355.4 m/λ se pudieron identificar ambos compuestos (IX y XN), siendo el XN mucho mayor (0.35 mg/g extracto) que el IX (0.074 mg/g extracto) (Tabla 2). Por tanto, se pudo concluir que el extracto de hexano obtenido mediante la extracción secuencial mostró casi 5 veces más XN que IX, algo similar a lo que ocurría con el extracto sólido líquido (6 veces más).

Se utilizaron los cromatogramas con longitudes de onda de 370 y 280 nm (cromatogramas b y c) para confirmar la presencia de los 2 compuestos de interés, además de otros que aparecen a tiempos de retención mayores al del XN, y que podrían ser compatibles con diferentes formas de α y β -ácidos.

2.3.2. Extracción con etanol

En la figura 7, se pueden observar los cromatogramas de la segunda fracción del extracto obtenido con etanol como disolvente:

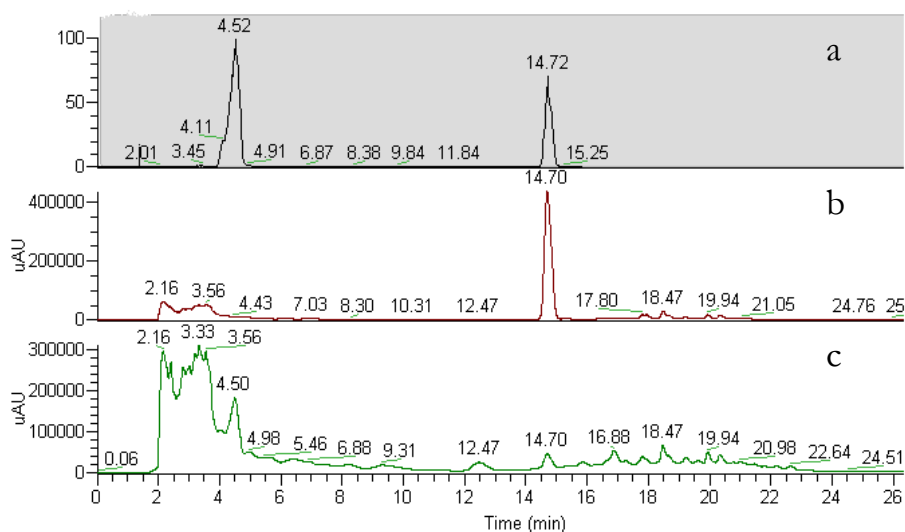


Figura 7. Extracto de la corriente iónica a 355.4 m/λ (a) y cromatogramas de la muestra extraída con etanol mediante la extracción secuencial a 150°C a 370 nm (b) y a 280 nm (c).

El primer cromatograma de esta figura pone de manifiesto que la diferencia de áreas de los 2 compuestos de interés es menor a la obtenida con las otras extracciones. En los 2 cromatogramas siguientes, a 370 nm y, principalmente, a 280 nm, también se

observa la extracción de compuestos compatibles con α y β -ácidos, pero en mucha menor cantidad.

La relación de IX:XN fue de 2; una relación mayor a la obtenida con el hexano, y superior a la que se se consiguió con la extracción individual de etanol. Sin embargo, sigue apreciándose una baja selectividad para el IX.

Tras el proceso de cuantificación se confirmó un mayor contenido de IX (5.15 mg/g extracto) que de XN (2.57 mg/g extracto), como se muestra en la tabla 3. Aún así, los resultados de XN fueron superiores a (2.57 mg/g extracto) que los obtenidos para la extracción individual con etanol (1.89 mg/g extracto). Estos resultados fueron similares a los mostrados por He y col. (2005) al utilizar SFE con CO_2 y etanol como modificador (en un intervalo del 80-100 %).

2.3.3. Extracción con agua

En la figura 8, se pueden observar los cromatogramas de la tercera fracción del extracto obtenido con agua como disolvente:

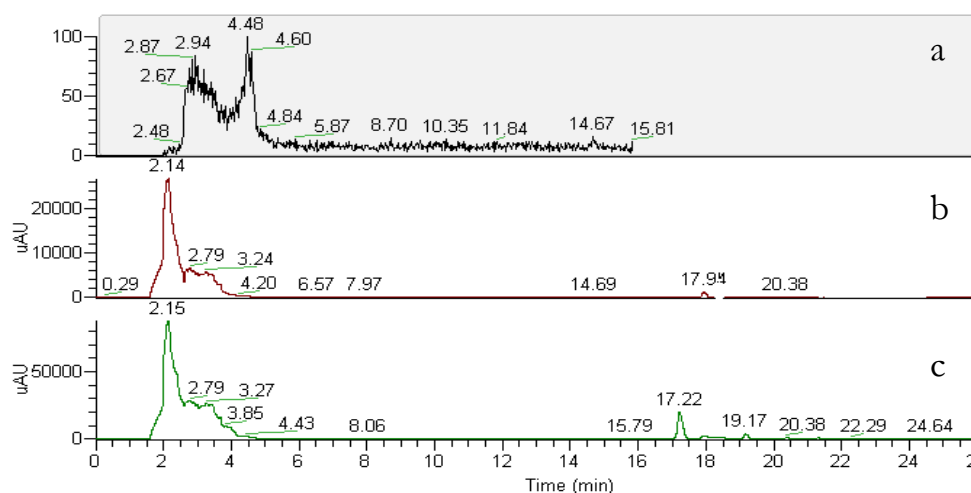


Figura 8. Extracto de la corriente iónica a 355.4 m/z (a) y cromatogramas de la muestra extraída con agua mediante la extracción secuencial a 150°C a 370 nm (b) y a 280 nm (c).

Los tres cromatogramas de esta figura muestran los niveles más bajos tanto de IX como de XN. Se obtuvieron 0.14 mg IX/g extracto y 0.01 mg XN/g extracto; ambos valores muy por debajo de los obtenidos con la extracción individual de agua a 150°C. Ello puede deberse a que la mayor parte de estos compuestos fueron extraídos con los dos disolventes utilizados previamente o al hecho de que su utilización incapacitara al agua para extraer estos dos compuestos.

La cantidad de IX y XN recogida en las diferentes fracciones de este extracto fue insignificante para las fracciones obtenidas con hexano y con agua (0.074 mg IX/g extracto y 0.35 mg XN/g extracto, y 0.14 mg IX/g extracto y 0.01 mg XN/g extracto, respectivamente), comparadas con la fracción acuosa o etanólica individual o la fracción etanólica de la secuencia, obteniéndose de esta última mayor cantidad (5.15 mg IX/g extracto y 2.57 mg XN/g extracto). Sin embargo, desde el punto de vista de la selectividad no resultó especialmente interesante, a lo que se suma el bajo interés que presenta el etanol para la industria alimentaria.

Además, se observó que la relación IX/XN aumentaba según lo hacía la polaridad del disolvente (0.2, 2 y 14 para hexano, metanol y agua, respectivamente), e incluso en la extracción con hexano (disolvente de menor polaridad), esta relación resultó superior a la del extracto con DMSO (extracto control). Este hecho sugirió la posible isomerización del XN en IX (Stevens y col., 1999 a, b; Chadwick y col., 2006) en las condiciones de extracción ensayadas.

Para una mejor comprensión, los resultados procedentes de las extracciones realizadas en condiciones subcríticas, se agrupan en las gráficas de las figuras 9 y 10.

Contenido de IX y XN en el lúpulo

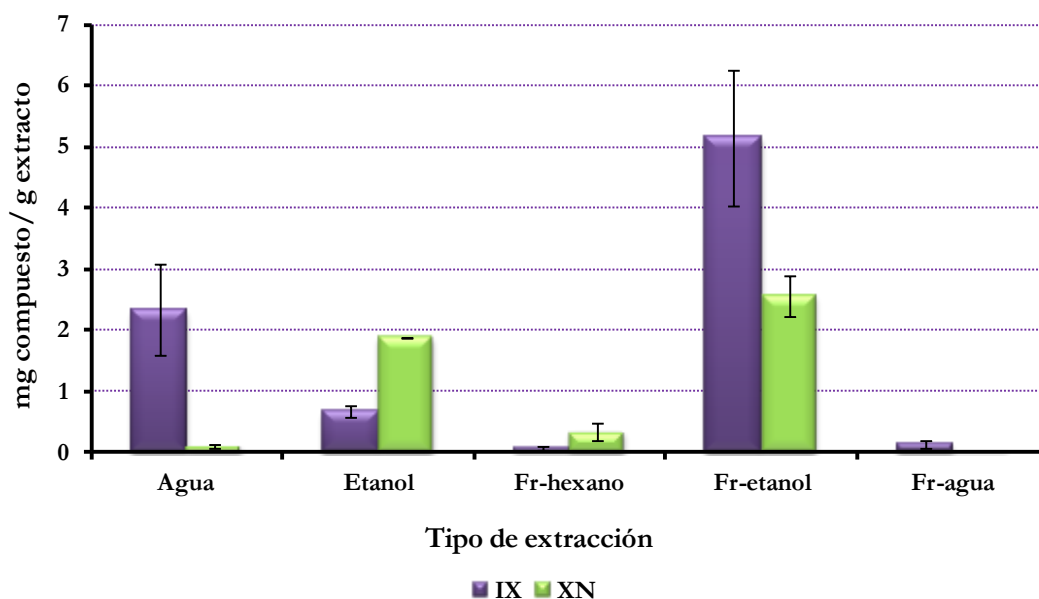


Figura 9. Contenido en miligramos de XN e IX por gramo de extracto en cada tipo de extracción. Agua: extracción con agua a 150°C. Etanol: extracción de etanol a 150°C. Fr: extractos de la extracción fraccionada (seguido del disolvente utilizado).

Contenido de IX y XN en el lúpulo

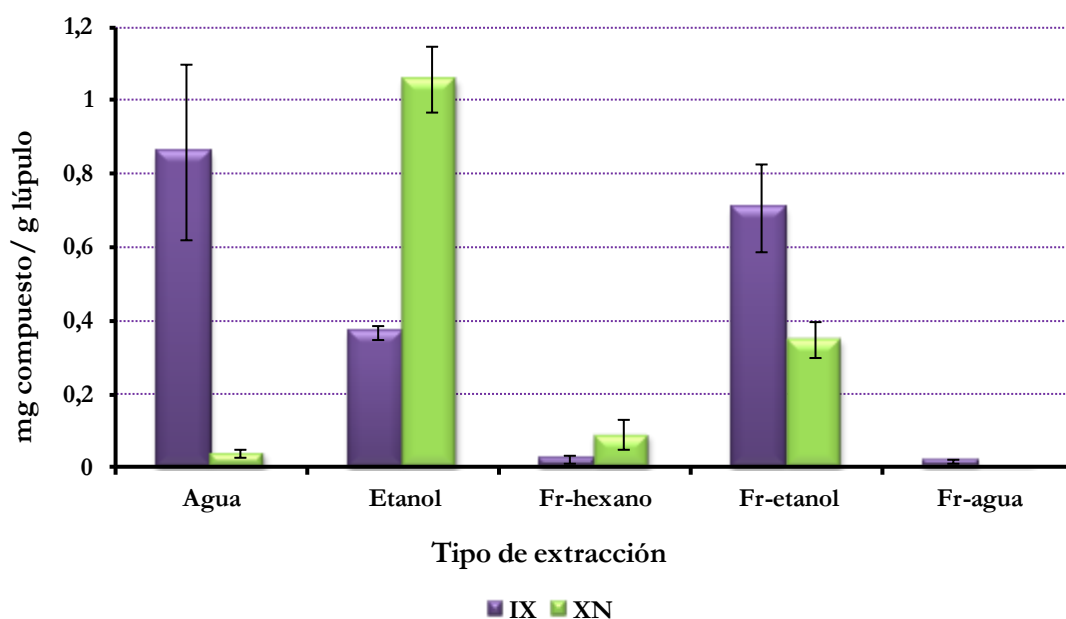


Figura 10. Contenido en miligramos de XN e IX por gramo de lúpulo en cada tipo de extracción. Agua: extracción con agua a 150°C. Etanol: extracción de etanol a 150°C. Fr: extractos de la extracción fraccionada (seguido del disolvente utilizado).

Es importante resaltar la diferencia de selectividad, respecto del IX, obtenida por diferentes métodos. La extracción realizada con agua, en condiciones subcríticas, a 150°C, presentó una selectividad mayor (21) que la correspondiente a los extractos secuenciales (0.20, 2 y 14 para hexano, etanol y agua, respectivamente) y la extracción individual con etanol presurizado (0.35).

Al comparar la extracción con agua presurizada frente al método de extracción de referencia (DMSO), se vio que incrementaba la relación IX/XN en 124 veces. Este aumento selectivo del IX respecto del XN podría deberse a la posible isomerización del XN en IX, lo cual se favorece a elevadas temperaturas y altas presiones, como es el caso del PLE. (Stevens y Page, 2004; Magalhães y col., 2007).

CAPÍTULO 4
Caracterización química: Desarrollo
de métodos de análisis de los
compuestos bioactivos

OBJETIVO

Aunque la metodología de análisis de compuestos fenólicos del vino está muy desarrollada, se ha considerado interesante realizar una adaptación de métodos para aplicar al control de calidad de la bebida funcional elaborada a partir de vino, y que estén disponibles cuando se requiera su uso. Por ello, en el presente capítulo se muestra el trabajo realizado con objeto de perfeccionar la metodología analítica para la caracterización química del perfil de polifenoles procedentes de la uva. Consiste en el desarrollo de dos métodos de análisis de compuestos fenólicos por HPLC, que ofrecen información complementaria:

El primero de ellos es un método de análisis global de compuestos fenólicos en el que no se busca una separación de compuestos individuales, sino el desarrollo de un perfil cromatográfico total, que proporciona una idea general de la composición fenólica en función de la polaridad de las moléculas; se persigue, pues, la elución de todos los compuestos fenólicos, cromatográficamente separables y no separables en una misma elución.

Con el segundo método se persigue obtener una alta resolución entre los compuestos fenólicos, que ofrezca la posibilidad de llevar a cabo su identificación.

INTRODUCCIÓN

Se conoce bien que todos los compuestos fenólicos se encuentran en la uva en muy pequeñas cantidades (1-200 mg), lo que unido a la gran variedad de estructuras, dificulta su separación y cuantificación. Por tanto, el análisis de todas estas moléculas es muy complejo; actualmente, se pueden analizar cualitativa y cuantitativamente sólo un 25-30 % de estos compuestos, correspondientes a los de muy baja masa molecular, relativamente fáciles de separar y cuantificar.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para el análisis de compuestos fenólicos fue iniciada por Lea y col., (1979). Durante la década de los 80 la técnica fue extensamente aplicada para la separación, tanto analítica como preparativa, de este tipo de compuestos.

El análisis de compuestos fenólicos por HPLC se lleva a cabo generalmente en fase reversa, con columnas de tipo organosilanos, siendo la más empleada la octadecil-silano (C18), aunque también se han empleado fases estacionarias más polares (Escribano Bailón, 1993). La fase móvil más utilizada es acetonitrilo/agua o metanol/agua, acidificada en pequeñas proporciones.

Hasta ahora se ha mantenido el concepto de separación individual de los compuestos fenólicos y su cuantificación, que normalmente se efectúa por varias técnicas analíticas: HPLC-PAD en fase reversa, más recientemente en fase normal o HPLC-MS, entre otras. Aun así las separaciones son muy complicadas y en la mayoría de los casos suelen requerir de pasos previos de purificación (Extracción L-L, SPE...), laboriosos y poco reproducibles.

Una alternativa muy atractiva al análisis de RP-HPLC previa purificación preparativa del extracto es el análisis con inyección directa, pero en este caso se enfrenta a la gran dificultad de resolver muchos analitos en poco tiempo (espacio), por lo que normalmente suelen ser métodos bastante largos, de 1-2 h. Dentro de este concepto como futuros desarrollos se puede plantear aumentar el tiempo de análisis haciendo gradientes todavía más suaves y eluciones más largas, lo que permitiría mejorar la resolución de un mayor número de picos; esto, hoy en día, desde un punto de vista técnico, puede ser factible dado el amplio uso de inyectoros automáticos (que permite series de análisis más largas sin necesidad de intervención).

Asimismo el desarrollo tecnológico de los equipos de HPLC en la actualidad, capaces de funcionar a mayores presiones y, por tanto, a menores tamaños de partícula en las fases estacionarias, posibilita la capacidad de aumentar la eficiencia de la columna disminuyendo el tamaño de partícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

Con objeto de reunir toda la casuística de complejidad de la muestra en cuanto a compuestos y concentraciones de los mismos, de modo que el método desarrollado tuviese una extensa aplicabilidad, se emplearon extractos de hollejos y semillas de uvas de las variedades Malvar y Merlot de la finca experimental “El Encín”, del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA, Alcalá de Henares, Madrid).

La obtención del extracto de semillas se llevó a cabo en un extractor piloto sólido-líquido de 25 L por ebullición de las semillas enteras en agua a 99°C durante 1 h. La proporción de semillas frescas:agua fue de 1:1. El extracto se clarificó por frío (4 °C) durante 2 días y los sólidos se separaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min.

La extracción de hollejos (13 kg) se efectuó en un extractor piloto sólido-líquido de 25 L por maceración de los hollejos en 13 L de etanol al 96 %, a 75°C aprox. durante 2 h. Finalizada la extracción se separaron los hollejos por escurrido del extracto y prensa del hollejo (se utilizó una prensa manual de tornillo de vendimia). El extracto se clarificó por frío (4°C) durante 2 días y 100 mL de éste se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min.

Previo al análisis por HPLC los extractos fueron filtrados a través de filtros de jeringa Millex HV 33 mm, hidrofílicos, PVDF de 0.45 µm de tamaño de poro (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

Para la identificación individual de los picos, 10 mL del extracto de hollejos de uva Merlot se sometieron a Ultrafiltración (UF), utilizando un cartucho de membrana centrífuga de corte molecular igual a 5 KDa (Amicon Ultra, de Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

2. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

2.1. Métodos de análisis mediante HPLC

2.1.1. Perfil de polaridades

- Sistema cromatográfico empleado para el análisis: HPLC Varian ProStar LC, Modelo 230, compuesto por una bomba ternaria, desgasificador en línea, muestreador-inyector automático, termostatizador de la columna cromatográfica y detector de fotodiodos alineados (PAD), conectados a una estación de tratamiento de datos Star (Varian Instruments, Walnut Creek, California, EEUU).
- Condiciones cromatográficas
 - Fase estacionaria: columna C18, Tracer Excel 120 ODSB, de 5 µm de tamaño de partícula, de dimensiones: 250 x 4.6 mm (Teknokroma, Barcelona); precolumna: del mismo material de la fase estacionaria.
 - Fase móvil:
 - Componente A: Agua/Ácido acético (98/2)
 - Componente B: Metanol/Ácido acético (98/2)

2.1.2. Compuestos individuales

- Sistema cromatográfico utilizado para el análisis: HPLC Varian 920-LC Galaxie compuesto por una bomba cuaternaria, muestreador automático, horno y detector de fotodiodos alineado (PAD), conectados a una estación de tratamiento de datos Galaxie.
 - Compuestos individuales (250 x 4.6 mm; 5 µm)
 - Fase estacionaria I: columna C18 Tracer Excel 120 ODSB, de 5 µm de tamaño de partícula, de dimensiones: 250 x 4.6 mm de Teknokroma (Barcelona); precolumna: del mismo material de la fase estacionaria, y dimensiones 9 x 4.6 mm.

- Compuestos individuales (15 x 2.1 mm; 3 µm)
 - Fase estacionaria I: columna C18 Tracer Excel 120 ODSB, de 3 µm de tamaño de partícula, 150 x 2.1 mm, de Teknokroma (Barcelona); precolumna: del mismo material de la fase estacionaria.
 - Fase estacionaria II: columna Kinetex C18, 100 Å de tamaño de poro, 2.6 µm de tamaño de partícula y de dimensiones: 100 x 4.6 mm, de Phenomenex (Torrance, California, EEUU); precolumna: del mismo material de la fase estacionaria.
 - Fase estacionaria III: columna C18, ACE-3-C18-AR, de 3 µm de tamaño de partícula, y de dimensiones 200 x 4.6 mm, de Advances Chromatography Technologies, (Aberdeen, Reino Unido); precolumna: del mismo material de la fase estacionaria, y de dimensiones: 20 x 4.6 mm.
- Fase móvil:
 - Componente A: Agua/Ácido Acético (98/2)
 - Componente B: Metanol/ Ácido Acético (98/2)

2.2. Método de análisis mediante HPLC-PAD-MS

- Sistema cromatográfico: HPLC serie 1100, de Agilent 1100 (Palo Alto, California, EEUU) compuesto por una bomba binaria, desgasificador en línea, inyector automático, un termostatzador de la columna cromatográfica y detector de fotodiodos alineados (PAD), conectados a una estación de tratamiento de datos Chemstation.
- Condiciones cromatográficas:
 - Fase estacionaria: Columna C18, ACE-3-C18-AR, de 3 µm de tamaño de partícula, y de dimensiones 200 x 4.6 mm, de Advances Chromatography Technologies (Aberdeen, Reino Unido); precolumna: del mismo material de la fase estacionaria, y de dimensiones: 20 x 4.6 mm.
 - Fase móvil:
 - Componente A: Agua/Ácido acético (98/2)
 - Componente B: Metanol/Ácido acético (98/2)

- Condiciones de análisis del detector de MS:
 - **Método de ionización:** la fuente de ionización es de tipo Multimodo (ESI y APCI), en modo de polarización negativa. Las condiciones de ionización empleadas en dicha fuente fueron las siguientes:
 - Voltaje de fragmentación: 120 V
 - Flujo del gas de secado: 5 L/min
 - Temperatura del gas de secado: 300 °C
 - Voltaje de capilar: 2000 V
 - Voltaje de carga: 2000 V
 - Presión del nebulizador: 40 psi (2.7 atm)
 - Temperatura del vaporizador: 200 °C
 - Corriente de corona: 5 μ A
 - **Método de análisis de MS:** se empleó un analizador de masas de cuadrupolo sencillo (LC-MC 6120 de Agilent), con un intervalo de masa de 100-1500 m/z , en modo "full scan".

3. REACTIVOS

- Para los extractos de hollejos se utilizó etanol (96 % de pureza), de Panreac (Barcelona).
- Para los análisis, se emplearon disolventes grado HPLC; metanol y acetonitrilo se adquirieron de Lab-Scan (Gliwice, Polonia) y ácido acético glacial, de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El agua Milli Q se obtuvo mediante un sistema de purificación integral de agua Milli Q, Millipore (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

4. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Las sustancias de referencia (patrones) utilizadas en todos los métodos de análisis por HPLC presentaban pureza HPLC y procedían de las casas comerciales Extrasynthese (Genay, Francia) y Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR RP-HPLC SEGÚN SU PERFIL DE POLARIDADES

Se partió del método de Pródanov y col. (2012), en fase reversa, optimizado para la evaluación de procianidinas en extractos de semillas de uva relativamente purificados, en las condiciones que se resumen a continuación:

- Equipo de HPLC Varian ProStar LC- 230
- Fase estacionaria: columna Tracer Excel 120 ODS
- Fase móvil (F.M):
 - Componente A (C.A): Agua/ Ácido Acético (98/2)
 - Componente B (C.B): Metanol/ Ácido Acético (98/2)

- Condiciones de elución:

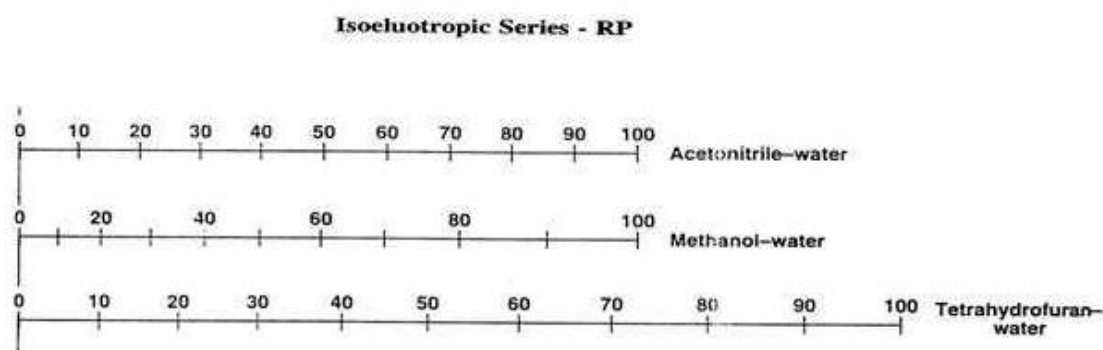
Tiempo(min)	C. A (%)	C. B (%)
0	90	10
30	65	35
40	25	75
45	25	75
50	90	10

- Flujo: 0.8 mL/min
- PAD: 280 nm; intervalo de barrido UV: 190-300
- Volumen de inyección: 10 µL
- Muestra analizada: extracto de semillas de uva Malvar
- Temperatura de la columna: 35°C

Aunque Pródanov y col. (2012) emplearon acetonitrilo como componente B de la fase móvil, cabe destacar que algunos trabajos paralelos llevados a cabo en nuestro laboratorio, (Pródanov y col., 2010), sobre la adaptación de las muestras de extractos de semillas y hollejos de uva para análisis por HPLC, obtenidos con disolventes de media-baja polaridad (mezclas hidroalcohólicas, hidroacetónicas), han demostrado que las procianidinas de mayor masa molecular son prácticamente insolubles en acetonitrilo (disolvente polar aprótico) y por tanto, representan un riesgo para la completa desorción de estos compuestos en una columna de fase reversa (C18) en la que se utiliza acetonitrilo como componente menos polar de la fase móvil. Además, el aumento desmesurado del precio de este disolvente, así como la escasez en su suministro fueron otros motivos adicionales para la sustitución del acetonitrilo por metanol. El único inconveniente que plantea este cambio es la alteración de los tiempos de retención de algunos compuestos conocidos, por lo que cabe esperar que la primera procianidina que eluya sea la B3, en lugar de la B1, que también puede aparecer después de la catequina. En todos los casos, son cambios mínimos que se pueden controlar, ya que actualmente se dispone de estos compuestos como sustancias de referencia.

Para la sustitución del acetonitrilo por metanol, como fase móvil, se han seguido las equivalencias de conversión de acetonitrilo en metanol según la tabla siguiente: (Grace Davison Discovery Sciences)

Tabla 1. Conversión de diferentes disolventes.



En estas condiciones, se muestra el perfil cromatográfico del extracto de semillas:

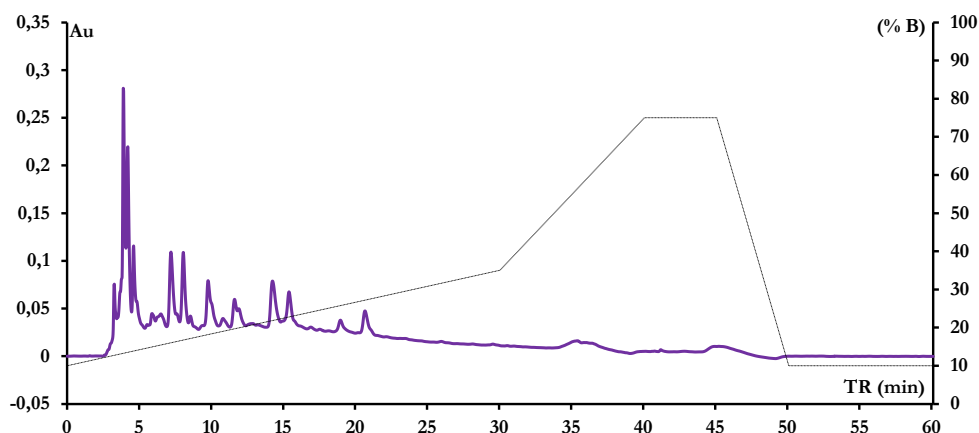


Figura 1. Cromatograma de un extracto de semillas de uva adquirido a 280 nm con el Método de Perfil de polaridades.

Se puede observar que los picos eluyen con escasa separación al principio del cromatograma, lo que indica que la proporción del componente menos polar de la fase móvil B al inicio de la elución es demasiado alto, resultando una elución muy rápida. Por tanto, se optó por una disminución del componente B al comienzo de la elución del 10 al 0 % para aumentar el tiempo de retención de los analitos, mejorando así su separación. Para asegurar la completa desorción de los compuestos menos polares de la columna se modificó la máxima proporción que alcanzaba el componente B en la etapa de lavado, aumentándola del 75 al 100 %. Tales cambios permitieron una reducción en el tiempo de análisis de 15 min.

En la figura 2 se muestra el efecto de esta adaptación del método de partida:

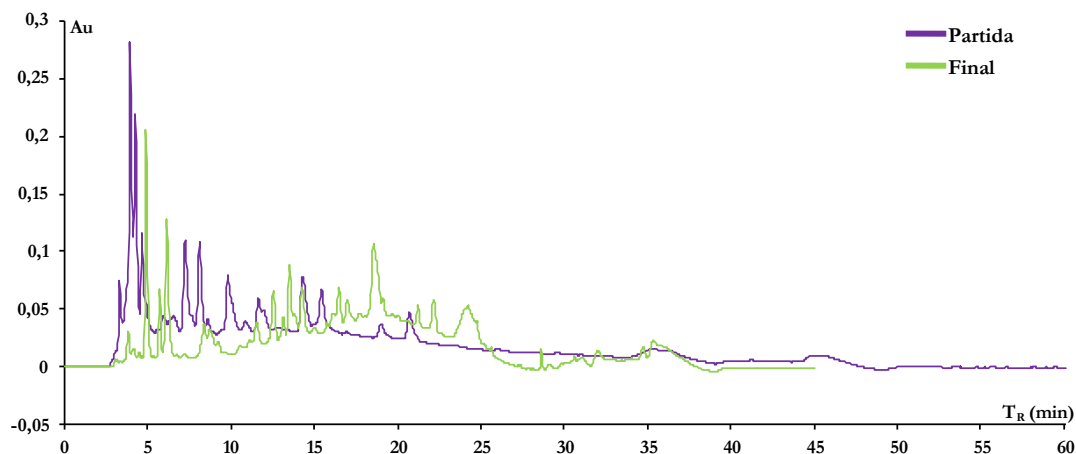


Figura 2. Cromatograma de un extracto de semillas de uva adquirido a 280 nm según el Método de Perfil de polaridades de partida y final.

De este modo se logró mejorar la distribución global de los picos dentro del cromatograma, optimizar la separación entre picos de un modo general y reconducir la elevación de la línea base (“montaña”) hacia la mitad del cromatograma, ya que inicialmente salía al principio. Además, mejoró, tanto la resolución de los dos picos principales como la separación en general de los picos situados sobre la elevación.

Con este método se ha obtenido un perfil global de los compuestos fenólicos presentes en un extracto de hollejos o semillas de uva en orden decreciente de polaridades. Además, permite hacer una estimación, más bien cualitativa, del contenido de aquellos compuestos fenólicos o complejos de éstos, que cromatográficamente no se pueden separar.

Cabe destacar que este proceso ha sido válido para el análisis de extractos acuosos o mezclas hidroalcohólicas de bajo contenido en alcohol (hasta un 20 %, como puede ser un vino), ya que la separación es mejor dentro de los compuestos más polares, que eluyen al principio del cromatograma.

Sería diferente si con este método se analizaran extractos, tanto de semillas de uva como de hollejos con elevado contenido en alcohol, más ricos en compuestos de polaridades intermedias, que eluyen prioritariamente en la segunda mitad del cromatograma. Esto se puede observar en la figura 3, en la que se comparan los

perfiles cromatográficos del ya conocido extracto acuoso de semillas de uva con un extracto de hollejos, con elevado contenido en etanol (50 %).

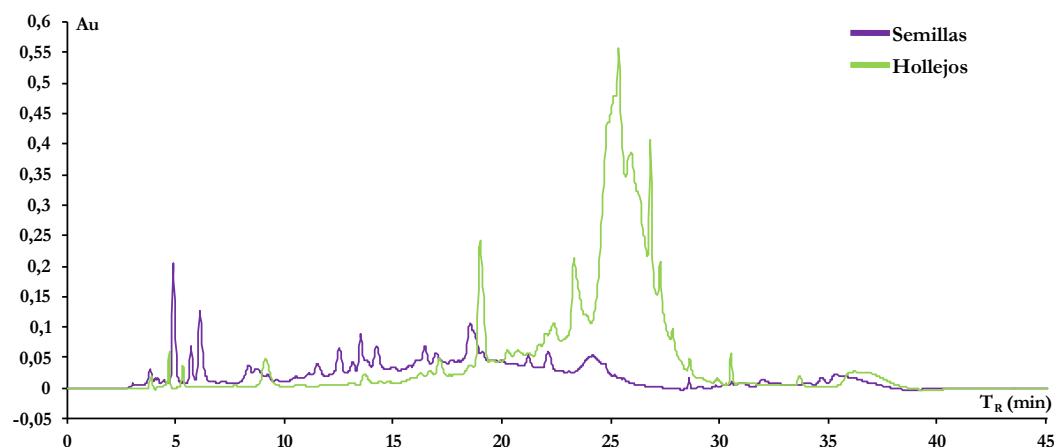


Figura 3. Cromatograma de un extracto de semillas y otro de hollejos de uva de la variedad Merlot adquirido a 280 nm según el Método de Perfil de polaridades.

Puesto que la separación en el extracto hidroalcohólico de hollejos no parece ser tan buena, se adaptó el método de análisis de semillas de uva, alargando el tiempo en el que el componente B de la fase móvil pasa del 29 al 100 % como se muestra a continuación:

Tiempo (min)	C. A (%)	C. B (%)
0	100	0
5	94	6
19	71	29
40	0	100
45	0	100
50	100	0
55	100	0

En la figura 4 se muestra el efecto de esta modificación sobre la separación de los picos del extracto hidroalcohólico de hollejos:

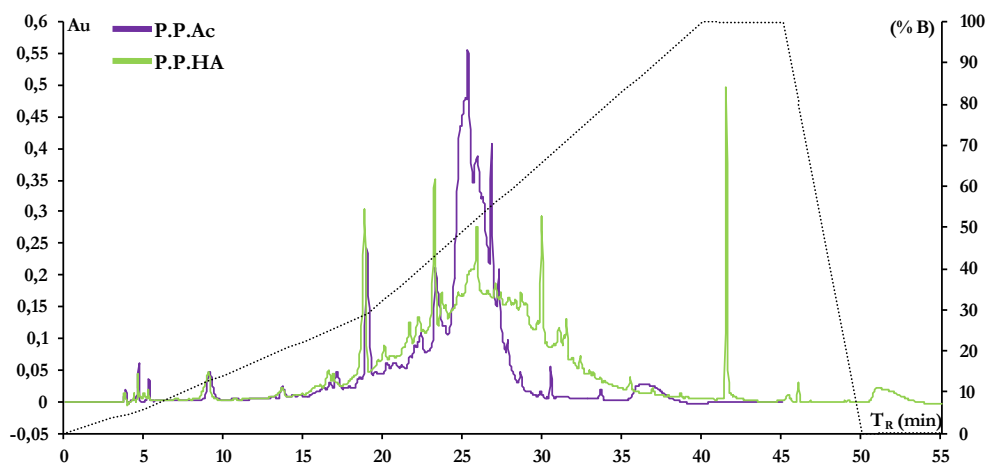


Figura 4. Cromatograma de un extracto de hollejos de uva adquirido a 280 nm según el Método de Perfil de polaridades para extractos acuosos (P.P.Ac) y extractos hidroalcohólicos (P.P.HA.) y perfil gráfico del componente B de la fase móvil durante la elución cromatográfica del Método de Perfil de polaridades para extractos hidroalcohólicos..

Se vio que aunque llevaba algo más de tiempo, el cambio merecía la pena, ya que la separación era bastante mejor, y la distribución de los picos mucho más adecuada que la del método de análisis para extractos acuosos.

Aunque en un principio, la puesta a punto de este método se planteó para el análisis de compuestos fenólicos en fracciones relativamente purificadas, se vio su gran utilidad en el análisis de compuestos fenólicos por perfiles. En este caso, no se pretendía conseguir una separación fina de estos compuestos sino un perfil global de los constituyentes de un extracto de hollejos de uva (o cualquier extracto vegetal) desarrollado en orden decreciente de polaridades. Además, permitió hacer una evaluación global de todos los constituyentes de los extractos que absorben a 280 nm, desde las moléculas más pequeñas hasta los componentes que cromatográficamente quedan sin separar (polímeros de proantocianidinas que aparecen como una elevación de la línea base) y que en extractos de semillas y hollejos de uva representan una parte importante de su contenido total (Cheynier, 2005).

2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES DE BAJA MASA MOLECULAR POR RP-HPLC

Para el análisis de compuestos fenólicos individuales de baja masa molecular se tuvo que desarrollar un método analítico que ofreciera una separación lo suficientemente fina de cada pico como para permitir su cuantificación. De los cromatogramas de perfiles de compuestos fenólicos de extractos de semillas y hollejos de uva brutos (sin purificación alguna) se pudo ver que en un tiempo de 50-60 min de desarrollo cromatográfico, y con las columnas de HPLC convencionales C18 de dimensiones: 250 x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μ m, era prácticamente imposible separar todos los constituyentes de estos extractos. Pruebas de elución con el mismo gradiente (de 0 a 100 % del componente menos polar (B) de la fase móvil) pero con un desarrollo cromatográfico mucho más lento (de hasta 5 ó 6 h) pusieron de manifiesto que la separación, en general, mejoraba, pero la diferenciación entre las catequinas y los dímeros de procianidinas más importantes (que era nuestro primer objetivo analítico), quedaba bastante limitada. Por tanto, hubo que dirigirse hacia un desarrollo cromatográfico en el que se pudiera lograr la separación suficiente de estos compuestos para su cuantificación individual, aunque en este caso se renunciase a la separación de otros compuestos fenólicos, principalmente oligómeros de procianidinas de menor polaridad y mayor masa molecular (trímeros y tetrámeros de proantocianidinas galoiladas). Se sabe que estos oligómeros de procianidinas son compuestos de polaridad media-alta, por lo que eluyen al principio del cromatograma. Para posibilitar su separación del resto de los compuestos (de mayor polaridad), se partió del método de Pródanov y col. (2012) desarrollado para el análisis de extractos de semillas de uva, donde igual que en el Método de Perfil de polaridades, se sustituyó el acetonitrilo por metanol acidificado. Este método se aplicó para el análisis de extractos semillas y hollejos de uva, con las siguientes condiciones:

2.1. Análisis de extractos acuosos

- Equipo de HPLC Varian 920 LC- Galaxie,
- Fase estacionaria: columna Tracer Excel 120 ODS (250 x 4.6 mm; 5 μ m).

- Fase móvil:

- Componente A (C.A.): Agua/Ácido Acético (98/2, v/v)
- Componente B (C.B.): Metanol/ácido Acético (98/2, v/v)

- Condiciones de elución:

Tiempo (min)	C. A (%)	C. B (%)
0	98	2
195	85	15
200	0	100
210	0	100
215	98	2

- Flujo: 0.7 mL/min
- PAD: 280 nm; intervalo de barrido UV: 190-300 nm
- Volumen de inyección: 10 µL
- Muestra analizada: extracto de semillas de uva Malvar
- Temperatura de la columna: 35°C

El cromatograma obtenido tras el análisis del extracto de semillas de uva se muestra en la figura 5:

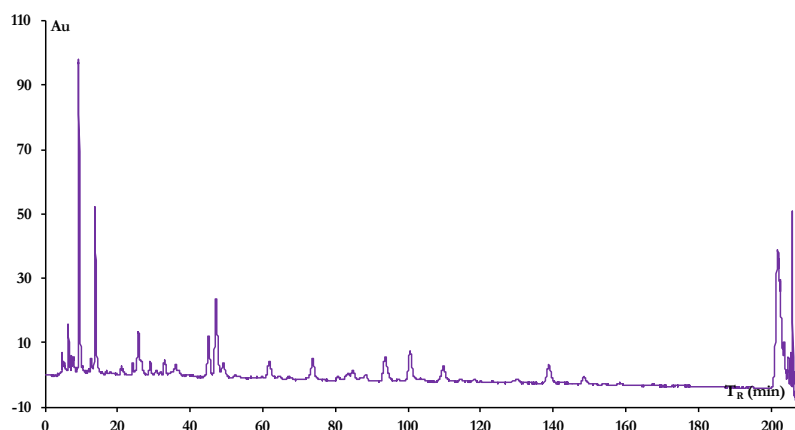


Figura 5. Cromatograma de un extracto de semillas de uva adquirido a 280 nm según el Método de análisis de extractos acuosos

Debido al gran número de picos para separar en este extracto y el tiempo de elución excesivamente largo (215 min) se optó directamente por un cambio de fase estacionaria con un tamaño de partícula más pequeño, con lo que se pretendía aumentar la resolución, y así recortar el tiempo de análisis. Para transferir las condiciones de elución de la columna de 5 a 3 μm , se han considerado los factores de conversión de flujo y gradientes recomendados por Restek (Restek Chromatography Products). Además, para poder obtener una mejor separación en los picos más polares, que eluyen al principio del cromatograma, se disminuyó la proporción del componente menos polar del 2 al 0 % al inicio, y para asegurar la completa elución de las PACs menos polares, se aumentó la proporción del componente B de 15 a 32 %, al final de la elución.

Se probaron 3 columnas de menor tamaño de partícula: Tracer Excel 120 ODSB, Kinetex C18 y ACE-3-C18-AR, siendo esta última la que proporcionó la mejor separación de los picos a una presión bastante aceptable para un equipo convencional de HPLC (130 bar). A continuación se muestran las condiciones cromatográficas alcanzadas tras la adaptación y el cromatograma obtenido con la columna ACE-3-C18-AR (Figura 6):

- Condiciones de elución:

Tiempo (min)	C. A (%)	C. B (%)
0	100	0
122	68	32
126	0	100
128	0	100
132	100	0

- Flujo: 0.6 mL/min
- PAD: 280 nm; intervalo de barrido UV: 190-300 nm
- Volumen: 10 μL
- Muestra: extracto de semillas de uva
- Temperatura de la columna: 35°C

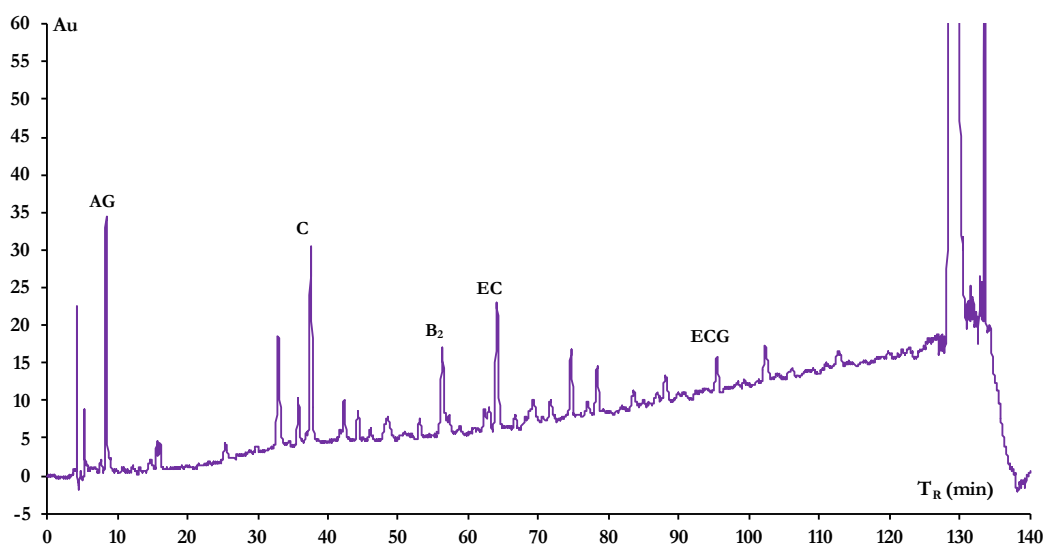


Figura 6. Cromatograma de un extracto de semillas de uva adquirido a 280 nm según el Método de análisis de extractos acuosos

En estas mismas condiciones cromatográficas se analizaron algunas de las sustancias de referencia más características de este tipo de muestra: AG, C, EC, B₂, ECG. Como se puede observar, se aprecia una buena separación de los principales compuestos en el extracto de semillas en un tiempo mucho más corto que el empleado en el método de patida.

2.2. Análisis de extractos hidroalcohólicos

Estas mismas condiciones se emplearon para el análisis de un extracto hidroalcohólico de hollejos de uva, cuyo perfil se muestra en la figura 7.

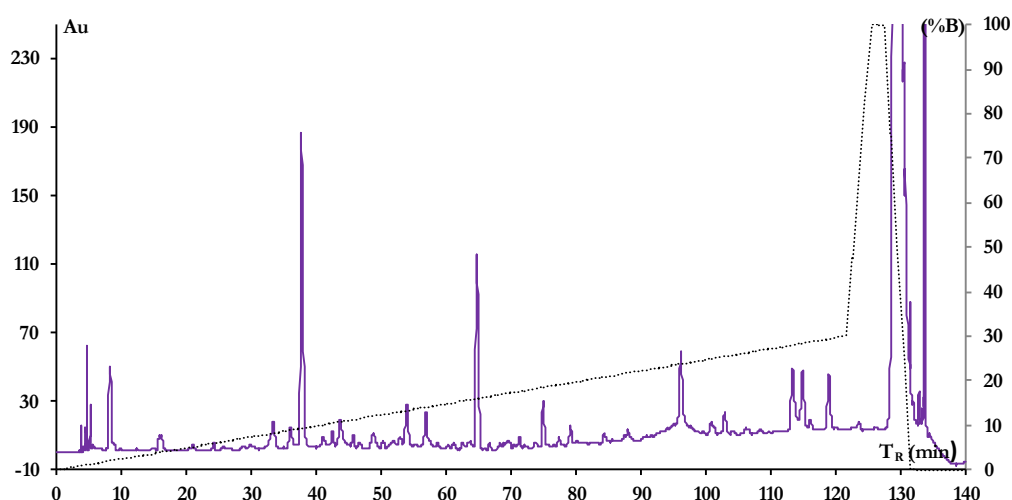


Figura 7. Cromatograma de un extracto de hollejos de uva adquirido a 280 nm y perfil gráfico del componente B de la fase móvil durante la elución cromatográfica según el Método de análisis de extractos hidroalcohólicos.

Se trata de un análisis con una buena separación de los picos, en un tiempo ligeramente inferior. El problema fundamental de este método es que no se aprecian los flavonoles, ya que éstos salen al final y todos juntos (Figura 7); por tanto, sería necesaria la implantación de un nuevo método, que ampliase la parte final del cromatograma, como se resume a continuación:

Tiempo (min)	C. A (%)	C. B (%)
0	100	0
80	80	20
115	72	28
190	50	50
200	42	58
212	20	80
217	0	100
227	0	100
230	100	0

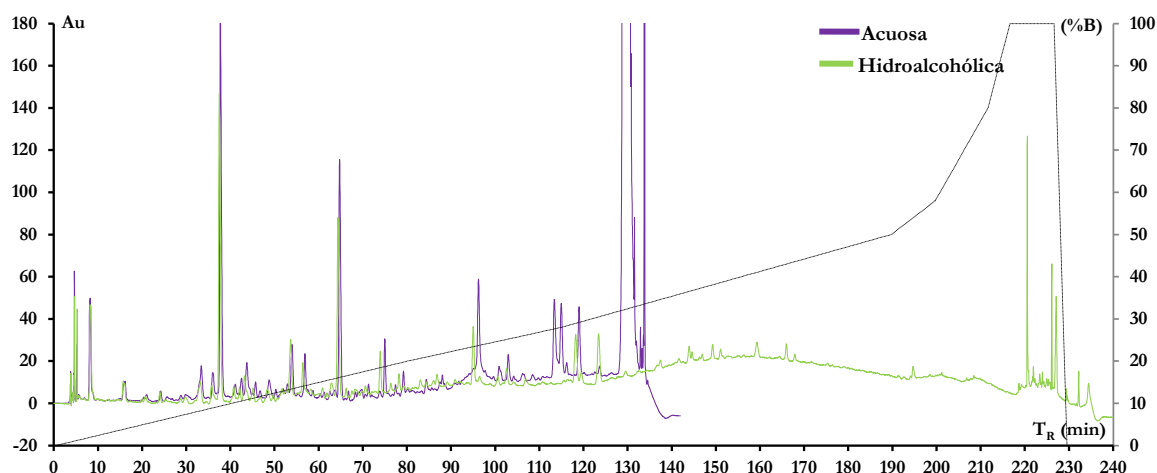


Figura 8. Cromatograma de un extracto de hollejos de uva adquirido a 280 nm según el Método de análisis de extractos acuosos e hidroalcohólicos y perfil gráfico del componente B de la fase móvil durante la elución cromatográfica.

Se puede observar que hasta el min 112 los cromatogramas son muy parecidos, existiendo una pequeña diferencia debida a la deriva de la línea base. A partir de ese minuto los picos se resuelven mejor, lo que se aprecia sobre todo en la separación del pico final del cromatograma correspondiente a flavonoles, mejorando así el método anterior en el que estos compuestos flavonólicos se solapaban al final del cromatograma. Por tanto, la separación resultó suficientemente buena, por lo que se estimó que éste fuera el método definitivo para el análisis de compuestos fenólicos en extractos hidroalcohólicos de hollejos de uva.

Por tanto, el método así desarrollado es largo (230 min), pero permite la separación fina de los principales compuestos mayoritarios e incluso minoritarios presentes en hollejos de uva obtenidos con extractantes de alta y media polaridad. Sin embargo, para los casos de análisis de extractos acuosos, la elución se puede desarrollar hasta un 30 % de metanol, que corresponde a unos 120 min, ya que a partir de este tiempo prácticamente no aparecen picos.

A partir de aquí se llevó a cabo el análisis de sustancias de referencia disponibles en el laboratorio, para la identificación de los constituyentes de los extractos de hollejos, con uno de los dos métodos establecidos (para muestras acuosas o hidroalcohólicas), en función de sus tiempos de retención.

Para poder identificar un mayor número de PC se ha analizado en las condiciones del Método de análisis de muestras hidroalcohólicas, un extracto de semillas de uva, previamente caracterizado por Pródanov y col. (2012), empleándolo como sustancia de referencia compleja, como se muestra en la figura 9.

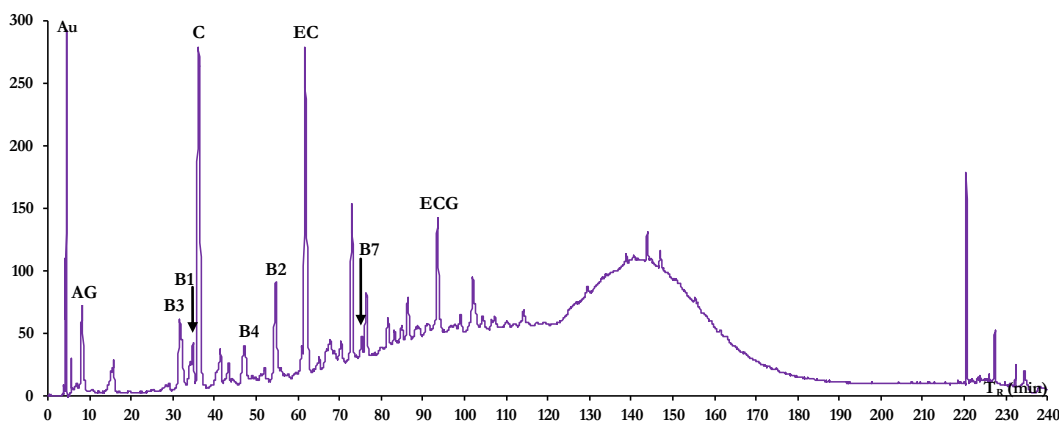


Figura 9. Cromatograma de extracto de semillas Merlot como sustancia de referencia según el Método de análisis de muestras hidroalcohólicas. AG: ácido gálico; C: catequina; ECG: epicatequingalato y procianidinas dímeras: B3, B1, B4, B2 y B7.

2.3. Identificación de compuestos fenólicos

El método así desarrollado permite la separación fina de la mayoría de los compuestos mayoritarios e incluso minoritarios presentes en hollejos de uva. Es evidente que los componentes con estructuras muy parecidas, y además minoritarios, serán muy difíciles de separar, incluso ralentizando todavía más el intercambio de los disolventes del gradiente.

Por tanto, dentro de las posibilidades de la fase estacionaria ACE-3-C18-AR siempre habrá compuestos que no se podrán separar del todo. Para esto hay que buscar otras alternativas; por un lado, seguir disminuyendo el tamaño de partícula, y aumentando el número de platos teóricos y, por otro, introducir un fraccionamiento previo de purificación semipreparativa de los extractos a analizar. En el primer caso, la mayor dificultad que se plantea es el hecho de que una disminución de tamaño de partícula de 3 a la más próxima (comercialmente disponible), 1.7 μm , conlleva una instrumentación específica diseñada para poder operar en condiciones de presiones

elevadas, que hoy día se conoce como UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography), es decir, requiere un equipamiento específico. La segunda alternativa puede ser más factible, ya que podría realizarse con los mismos aparatos disponibles actualmente, pero con una metodología de fraccionamiento más laboriosa. Por tanto, considerando el número de picos resueltos actualmente con este método, puede asumirse un avance significativo en la separación de CF en comparación con los métodos anteriores.

Tras la adquisición de los tiempos de retención y espectros UV de las sustancias de referencia, se procedió al análisis del extracto de hollejos de uva Merlot, previamente purificado por una membrana de ultrafiltración de 5 KDa de corte molecular. Para la identificación de compuestos de los que no se disponía de sustancias de referencia, se utilizó un HPLC-PAD acoplado a un detector de masas. El cromatograma adquirido a 280 nm y la corriente iónica total se muestran en la figura 10.

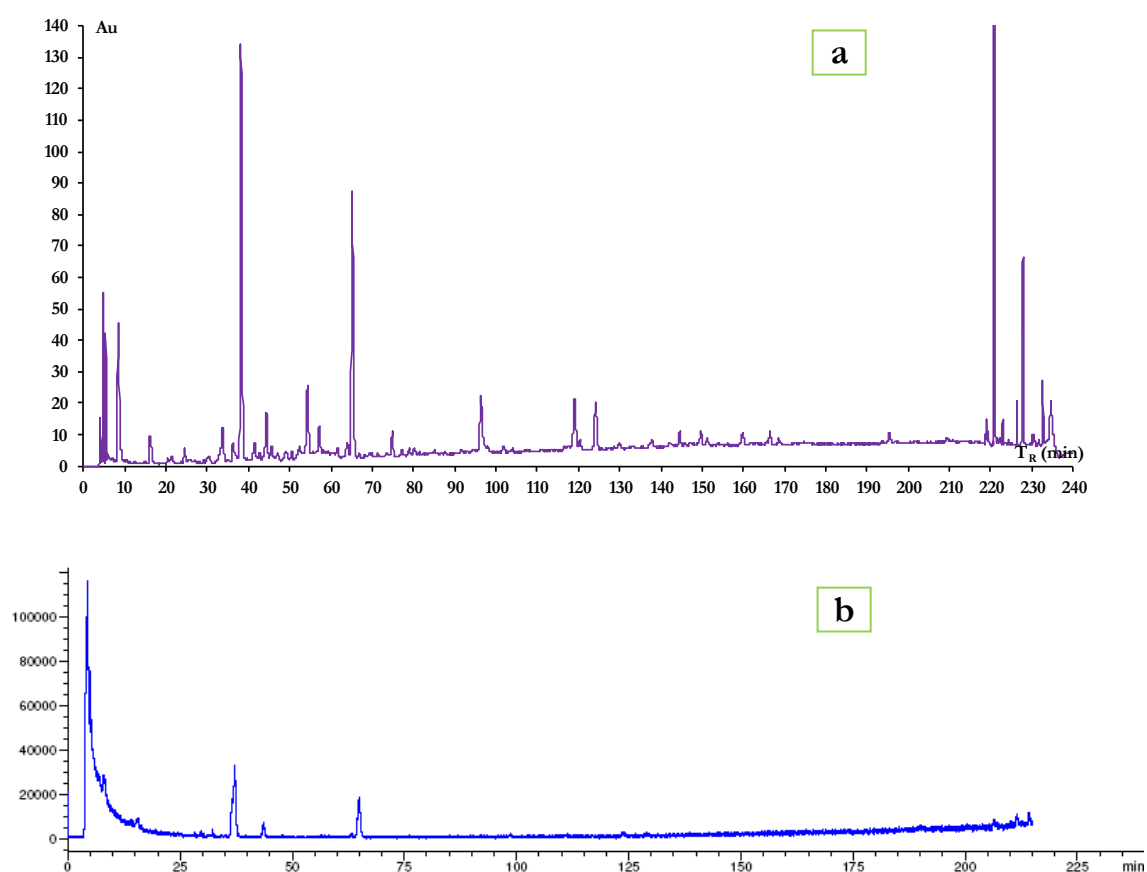


Figura 10. Cromatograma de extracto de hollejos Merlot ultrafiltrado por una membrana de 5 KDa, según el Método de análisis de muestras hidroalcohólicas, a 280 nm (a) y la corriente iónica total (b).

Para poder identificar los picos con mayor precisión, el cromatograma UV se separa en dos zonas como se muestra en la figura 11.

La primera sección del cromatograma se muestra a 280 nm porque en primer lugar eluyen los CF no flavonoides y PACs, que absorben a esta longitud de onda, mientras que la segunda parte se muestra a 360 nm, longitud de onda en la que los flavonoles presentan una mayor intensidad de absorción.

En la tabla 1 se muestran los compuestos identificados mediante HPLC-PAD-MS.

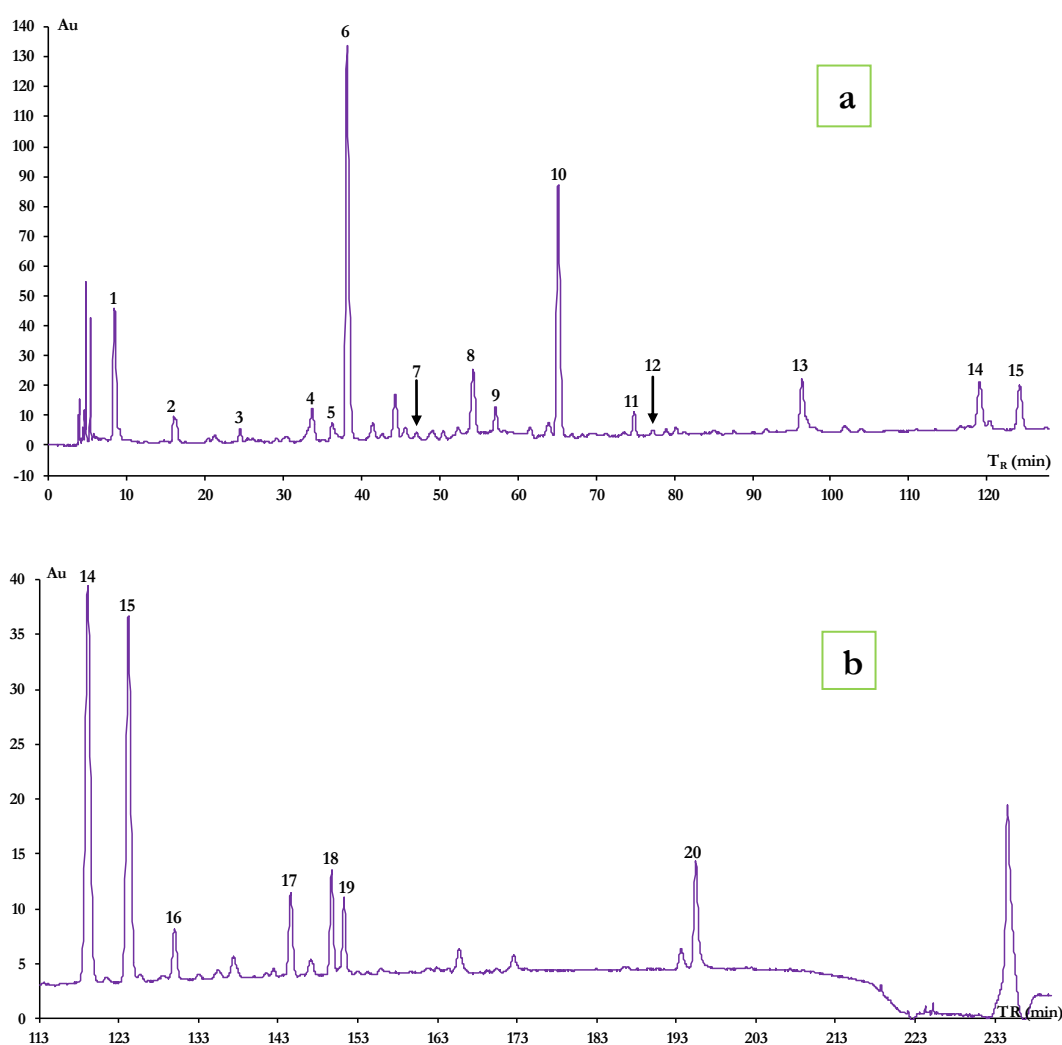
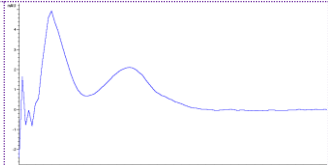
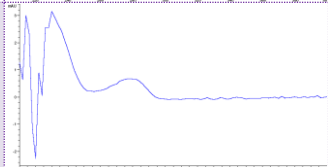
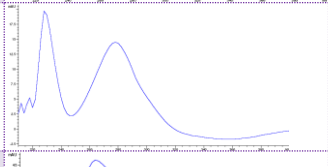
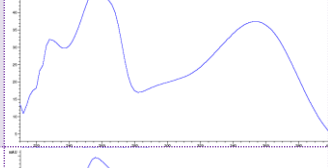
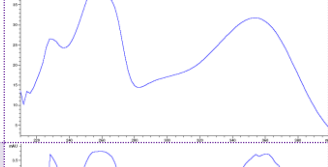
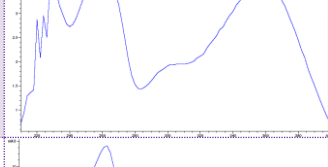
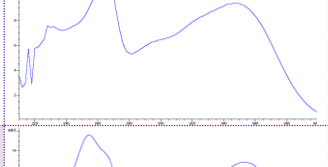
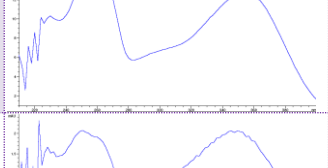
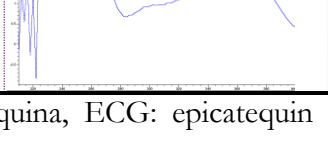


Figura 11. Cromatograma de extracto de hollejos Merlot ultrafiltrado por una membrana de 5 KDa, según el Método de análisis de muestras hidroalcohólicas, del min 0 al 125, a 280 nm (a) y del min 113 al 225, a 360 nm (b).

Tabla 1. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-PAD-MS

Pico	T _R (min)	Molécula	UV-VIS	[M-H] ⁻	Ion producto	Espectros
1	8.6	Ácido gálico	273	169.0	125.0	
2	15.6	Ácido Protocatéquico	225/257/ 296	153.1	169.0	
3	23.2	Metil galato	275	182.8		
4	32.1	NI + PC2 (B3)	232/282/ 308	576.9/ 1490.2		
5	35.1	PC2 (B1)	280	576.9		
6	37.0	C + EGC	280	305/ 289.1		
7	48.0	PC2 (B4)	279	576.8		
8	53.7	Ácido Sirínico	274	197.9		
9	56.4	PC2 (B2)	230/280	577.0		
10	64.5	EC	279	289.1		

11	75.2	PC2-G (B ₁ -G + B ₂ -G)	277	729.0		
12	77.5	PC2 (B7)	280	577.0		
13	98.7	ECG + Malvidina-3-Glu	228/278/ 525	441.0		
14	123.5	Quercetina-3-O-glucurónico	257/265 (sh)/299 (sh)/354	477.0 (463)		
15	128.8	Quercetina-3-O-glucósido + PC2 (B5)	257/265 (sh)/295 (sh)/353	463.0/566 .9	ion doble cargado 927.0	
16	134.5	Laricitrina-3-O-glucósido	256/265 (sh)/301 (sh)/358	492.8		
17	149.2	Kaempferol-3-O-glucósido	265/298 (sh)/320 (sh)/348	447.0		
18	154.6	3-metil quercetina-3-O-glucósido (isoramnetina-3-O-glucósido)	255/265 (sh)/297 (sh)/354	477.0		
19	156.0	Siringetina-3-O-glucósido	254/265 (sh)/300 (sh)/357	507.0		

*NI: no identificado, C: catequina, EC: epicatequina, EGC: epigallocatequina, ECG: epicatequina galato, G:éster galoilado, PC: procianidina, sh: hombro.

Los picos 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 13 y 18 correspondientes al ácido gálico, ácido protocatéquico, metil galato, PC B1, C+EGC, ácido sirínico, PC B2, EC, ECG + malvidina 3-monoglucósido, e isoramnetina-3-O-glucósido, se identificaron por tiempo de retención, espectro ultravioleta y masa de sustancias de referencia comerciales analizadas en las mismas condiciones cromatográficas.

Los picos 4, 7, 12 y 15 correspondientes a la PC B3, B4 y B7, respectivamente, se identificaron por tiempo de retención, espectro ultravioleta (λ_{max} 280) y masa (m/z 577) iguales a las correspondientes en el extracto de semillas de uva, utilizado como patrón complejo (Figura 9).

El pico 11 corresponde a las PC dímeras monogaloiladas B1-G, B2-G, que siempre eluyen en un mismo pico (Escribano-Bailón y col., 1992; Pródanov y col., 2012).

El resto de los picos: 14, 15, 16, 17 y 19, correspondientes a quercetin-3-glucurónido, quercetina-3-glucósido, laricitrina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-glucósido y siringetina-3-O-glucósido, se identificaron por tiempo de retención, espectro ultravioleta, masas y referencias bibliográficas (Castillo Muñoz y col., 2009).

En resumen, se han identificado:

- 4 Ácidos hidroxibenzóicos y derivados:
 - Ácido gálico, protocatéquico, sirínico y metilgalato.
- 12 Flavan-3-oles:
 - Catequinas: C, EC, ECG y trazas de EGC
 - Procianidinas dímera no galoiladas: B1, B2, B3, B4, B5 y B7
 - Procianidinas dímeras monogaloiladas: B₁-G y B₂-G
 - Prodelphinidinas: ninguna
- 7 Flavonoles:
 - Myricetina-3-glucósido, Quercetina-3-glucurónido, Quercetina-3-glucósido, Laricitrina-3-glucósido, Kaempferol-3-glucósido, Isorhamnetina-3-glucósido y Syringetin-3-glucósido
- 1 Antociano:
 - Malvidina-3-glucósido

Por otro lado, se ve una clara división por grupos en las diferentes zonas del cromatograma. Al principio eluyen los compuestos más polares y de muy baja masa molecular, como los ácidos hidroxibenzoicos. Posteriormente lo hacen las procianidinas (min del 32 al 129), con una zona de solapamiento entre ambos grupos. Al final de la elución de las procianidinas, éstas solapan con antocianos y flavonoles, los cuales aparecen a partir del min 99.

En general, se puede decir que este extracto contiene una gran variedad de compuestos fenólicos: ácidos hidroxibenzóicos, flavonoles, antocianos y flavan-3-oles. Entre los flavan-3-oles se encontraron la C, la EC, 6 dímeros de procianidinas no galoiladas y 2 monogaloiladas (B1-G, y B2-G), lo que resulta contradictorio con algunos datos bibliográficos, que hablan de la presencia de una gran variedad de especies de PACs (Souquet y col., 1996). En función de la altura de los picos, las procianidinas B3 y B2 parecen estar en mayor concentración que la B1, a diferencia de lo que publicaron Sun y Spranger (2005), donde la PC B1 predominaba entre los dímeros de hollejos de uva tinta. También llama la atención que no se encuentran procianidinas de mayor grado de polimerización, ni siquiera algún trímero, ni de mayor grado de galoilación, ambos descritos en la bibliografía, a pesar de que se buscaron explícitamente por extracción de los iones correspondientes. Tampoco se han encontrado prodelphinidinas, que según la literatura deberían estar presentes (Souquet y col., 1996). Sólo en el pico correspondiente a la catequina se encontró una señal m/z de 305, correspondiente a la epigallocatequina, pero era muy débil, debido probablemente a la poca concentración en la que se encontraba. Cabe destacar también la ausencia total de ácidos hidroxicinámicos (Cantos y col., 2002); sin embargo, hay que resaltar la gran cantidad de flavonoles encontrados: además de los siete picos identificados existen, al menos, otros cuatro con espectros muy parecidos, pero pendientes de identificación.

Cabe destacar la presencia de una gran cantidad y variedad de compuestos que eluyen con el frente del cromatograma (los primeros 20 min) y que realmente no se pueden apreciar por su mínima absorbancia a 280 nm, pero sí por la intensa elevación de la corriente iónica total (TIC), donde se encontraron iones correspondientes posiblemente a los ácido glucónico, sacarínico, tartárico, cítrico, sinápico, sacarosa, varias hexosas y pentosas, maltitol, sinapaldehído, metilbenzaldehído y ácido hidroxicinámico, entre otros.

Numerosos autores destacan la presencia en hollejos de uva de los siguientes compuestos: los ácidos gálico y protocatéquico, las PC B1 y B3, los flavonoles Quercetin-3-glucurónido, Quercetina-3-glucósido, Kaempferol-3-O-glucósido y la Malvidina 3-monoglucósido (Souquet y col., 1996; Macheix y col.1990; Rodríguez Montealegre, 2006; Chira y col., 2008; Obreque-Slier y col., 2010;). Por otro lado, Castillo Muñoz, y col. (2007 y 2009) y Gómez-Alonso y col.(2007) identificaron 18 flavonoles en diferentes variedades de uva, algunos de los cuales se corresponden con los identificados en nuestro extracto, tanto por orden de elución como por espectros UV y masas, mientras que Obreque-Slier y col. (2010) y Rodríguez Montealegre (2006) encontraron miricetina-3-glucósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-glucósido e isoramnetin-3-O-glucósido en los hollejos de las variedades de uva Carménère y Cabernet Sauvignon.

Los ácidos gálico y protocatéquico, así como los flavonoles quercetina-3-O-glucurónido, Quercetina-3-O-glucósido, Kaempferol-3-O-glucoside e isorhamnetin-3-O-glucósido, fueron identificados en nueve orujos de uva de vinificación estudiadas por Kammerer y col. (2004). Asimismo, Alonso y col. (2002) encontraron ácido gálico, y sirínico, así como catequina y EC, en los hollejos de diferentes variedades de uva.

Cabe destacar que por extracción de espectro UV a 520 nm aparecen otros 7 u 8 picos, posiblemente antocianos, que por el momento no se han identificado debido a la ausencia de datos de masas. En general, estos compuestos eluyen en el último tercio del cromatograma; lo que indicaría su naturaleza menos polar, cuya ionización podría verse afectada, traduciéndose en una falta de señal de masas en modo negativo.

CAPÍTULO 5.
Caracterización funcional:
evaluación in vitro e in vivo de la
actividad biológica

OBJETIVO

El presente capítulo tiene como principal objetivo la evaluación preliminar de la actividad cardiosaludable potencial de un modelo de bebida diseñada según las herramientas desarrolladas en los capítulos anteriores de este trabajo de Tesis Doctoral; por tanto, se pretende realizar una aproximación a la validación de dichas herramientas, abordando la evaluación de la actividad biológica tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo sobre una línea celular de macrófagos humanos en la que se simuló el proceso inflamatorio mediante la adición de oxLDL en el medio de cultivo. A este medio se le añadió el extracto de lúpulo para determinar su posible efecto antiinflamatorio. Para ello se mide la secreción al medio de cultivo de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 e IL-6) y citoquina antiinflamatoria IL-10, mediante la técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo una vez obtenidos los resultados de los ensayos *in vitro*. Estos experimentos son más apropiados para la observación de efectos fisiológicos finales y totales de la bebida funcional. Entre estos efectos fisiológicos, uno de los más interesantes es el estudio del estrés oxidativo, mediante la determinación de la peroxidación lipídica.

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que los polifenoles del vino poseen la capacidad de ejercer efectos cardioprotectores. Por ejemplo, Shanmuganayagan y col. (2007) realizaron un estudio *in vivo* con conejos suplementando una dieta hipercolesterolémica con mosto. Tras el estudio se observó una reducción de la agregación plaquetaria y de la formación de la placa de ateroma en los conejos suplementados con respecto a los controles. Dell Agli y col. (2005) observaron que el vino y los hollejos de uva inhibían la actividad de la enzima fosfodiesterasa-5, lo que disminuía el riesgo de ECV mediante la reducción de la tensión vascular. Tsanga y col. (2005) vieron una reducción en la oxidación de LDL tras el consumo de menos de dos copas de vino en voluntarios sanos. Además existen estudios comparativos con vino desalcoholizado, por ejemplo, Vinson y col. (2001) compararon el efecto del etanol y los polifenoles utilizando vino tinto desalcoholizado y mosto en la formación de la placa de ateroma. Los resultados mostraron que para una misma cantidad de polifenoles, el mosto fue el más efectivo inhibiendo la aterosclerosis y mejorando los parámetros lipídicos y antioxidantes. Estos resultados coinciden con los de otros autores, que han demostrado un efecto protector frente a la aterosclerosis y ECV (Pace-Asciak y col., 1996; Stocker y O'Halloran, 2004).

Sin embargo, como ya se ha comentado, hay otros tipos de polifenoles no presentes en el vino, que poseen además, capacidades diferentes y complementarias a aquellos. Por ejemplo, polifenoles del lúpulo como XN e IX. El IX, además de ser un precursor directo de un potente fitoestrógeno en la dieta, ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias (Possemiers y col., 2008; Young-Chang y col., 2010; Jeong Ho y col., 2010). Similares propiedades se le han atribuido al XN, al inhibir la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α y NO en macrófagos murinos (Cho y col., 2008). Estos autores determinaron en otro estudio que la suplementación en el medio de cultivo de macrófagos murinos reducía la IL-12 (Cho y col., 2010). Zhao y col. (2003) concluyeron que el XN es capaz de inhibir la producción de NO suprimiendo la expresión de iNOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS IN VITRO

1.1. Muestras

Extractos de lúpulo obtenidos en condiciones subcríticas a 150°C con agua como disolvente (método de obtención detallado en el capítulo 4).

1.2. Reactivos

- Medio de cultivo RPMI 1640, de American Type Culture Collection, Teddington (ATCC) (Middlesex, Reino Unido).
- Suero fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomycin, L-glutamina, Tripan Blue, PBS de GIBCO, Invitrogen (Pasley, Escocia).
- β -mercaptoetanol, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato sódico (SDS), Indometacina de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EEUU).
- Dimetilformamida de Panreac, Sau (Barcelona).
- Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) fueron donadas por el Servicio de Bioquímica e Investigación del Hospital Ramón y Cajal (Madrid).

1.3. Métodos

1.3.1. Cultivo celular

La línea celular utilizada fue THP-1, monocitos humanos de ATCC, empleando como medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 0.05 mM de β -mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina. El cultivo de monocitos se realizó en suspensión con una densidad entre $3\cdot 10^5$ células/mL en un incubador en condiciones estables de temperatura, 37°C, y atmósfera del 5 % de CO₂ y 95 % de O₂. El medio de cultivo se

reemplazó cada 3 o 4 días y se utilizaron células con menos de 20 reemplazos de medio de cultivo.

La diferenciación de los monocitos, células que crecen en suspensión, a macrófagos, con capacidad de crecer en monocapa adheridos a una superficie, se llevó a cabo utilizando PMA (Takashiba y col., 1999). Las células se centrifugaron a 110 g (Hettich, Universal 320-R, Buckinghamshire, Inglaterra) durante 10 min y se determinó su viabilidad mediante el método de exclusión con Tripán Blue (Tolnai y col., 1975). A continuación se suspendieron las células en medio de cultivo suplementado con 10 % de FBS que contenía 100 ng/mL de PMA, hasta conseguir una concentración de $5 \cdot 10^5$ células viables/mL y se añadió 1 mL en cada uno de los 24 pocillos de la placa. Tras mantener las células 48 h en un incubador, se observó en el microscopio la morfología característica de los macrófagos, se lavaron con PBS y se trataron con el extracto a ensayar.

1.3.2. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los extractos fue determinada utilizando el método de respiración mitocondrial dependiente de la reducción del MTT (Sampson, 1924). A los macrófagos, se le añadieron diferentes concentraciones del extracto de lúpulo disuelto en DMSO y se incubaron durante 24 h a 37°C en 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de ensayo se lavaron los pocillos utilizando PBS y se incubaron con 0.5 mg/mL MTT en PBS durante 4 h a 37°C y 5 % de CO₂. Debido a la acción de la enzima hidrolasa mitocondrial, únicamente activa en las células viables, se formaron cristales de formazán a partir de MTT. Para determinar la producción de los cristales de formazán se lisaron las células con un tampón de lisis durante 12 h, formado por 10 % de dodecilsulfato sódico (SDS) y 50 % de dimetilformamida a pH=4.7, consiguiendo así la disolución de los cristales de formazán. La absorbancia de cada pocillo se midió a 570 nm usando un lector de absorbancia para microplacas (Sunrise Remote, Tecan Austria GmbH, Grödig, Salzburg, Austria). La absorbancia del formazán resultante en los pocillos sin tratamiento, únicamente macrófagos y medio, fue considerada como el 100 % de viabilidad, comparándose su absorbancia con la del resto de los tratamientos para determinar la citotoxicidad del extracto de lúpulo.

1.3.3. Ensayo de bioactividad

El extracto de lúpulo se disolvió en DMSO hasta una concentración de 10 mg/mL. Las células THP-1 se diferenciaron en placas de 24 pocillos, con $5 \cdot 10^5$ células por pocillo. Una vez diferenciadas las células se trataron con 10 µg/mL del extracto, 5 µg/mL de Indometacina o 0.0234 µg/mL de IX y en todos los casos con LDL, oxidadas con Cu^{2+} a una concentración de 75 µg/mL, con el objetivo de inducir una respuesta inflamatoria en los macrófagos (Poli y col., 2009), a excepción del control negativo, que únicamente tenía medio de cultivo. La oxidación de LDL se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito por Steinbrecher (1987), que de forma resumida, consistió en preparar una disolución de LDL con 5 µM CuSO_4 e incubarlo a 37°C durante 3 h.

1.3.4. Ensayo ELISA para la cuantificación de citoquinas

El medio de cultivo donde crecieron las células de los estudios se centrifugó a 1200 g (Hettich, Universal 320-R) para eliminar las impurezas que pudieran quedar. Para determinar la concentración en el medio de las citoquinas estudiadas: $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6 e IL-10 se utilizaron los kits de enzimo inmunoensayo (ELISA) de BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, EEUU), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, 100 µL de una dilución 1:10 del medio de cultivo se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía el anticuerpo primario que reconoce a la citoquina específica y se dejó incubando durante 2 h. Después de lavar las placas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario capaz de reconocer al anticuerpo primario. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las placas y se incubaron durante 30 min en oscuridad con la solución de sustrato. Finalmente se añadió la solución de parada y se leyó la absorbancia a 450 nm con una corrección a 570 nm usando un lector de microplacas (Sunrise Remote, Tecan Austria GmbH, Grödig, Salzburg, Austria).

Para realizar los cálculos se tomó como control con valor 100 % el resultado de las muestras pertenecientes al tratamiento con LDL oxidadas, con respecto al que se comparaban los demás resultados.

1.3.5. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm SD. Para la comparación de los datos se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) y el post-test Dunnett, a un nivel de significación de $p \leq 0.05$. La realización de los cálculos se llevó a cabo usando el programa informático SigmaStat Statistical software (Windows Version 5.0 Systat Software Inc., Point Richmond, California, EEUU).

2. ESTUDIOS IN VIVO

2.1. Elaboración de la bebida funcional

Se preparó una bebida funcional modelo a base de un vino desalcoholizado (1.1 % de etanol) mediante SFE (capítulo 2), al que se le añadieron 50 mL de extracto de lúpulo (capítulo 4) por cada litro de este vino.

2.2. Descripción del modelo

Para la evaluación del efecto de la bebida en la población general sana, se diseñó un modelo animal joven y sano al que se le sometió a un leve estrés cardiovascular, mediante la suplementación de la dieta con colesterol.

El estudio se llevó a cabo en 24 ratas Wistar machos adultos (machos de dos meses y peso medio $278.3 \text{ g} \pm 12.6$) procedentes de un distribuidor oficial (Charles River). Los animales se estabularon en grupos de 4 en el animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz (HULP) (Nº 280790001941) donde se realizaron los experimentos. Los animales fueron pesados individualmente a tiempo cero. En todo momento se siguió la normativa vigente sobre protección de los animales para experimentación RD 1201/2005. Así mismo, se contó con la aprobación por parte del Comité Ético de Bienestar Animal del HULP.

Los animales fueron distribuidos en tres grupos de manera aleatoria, tal y como se resume en la tabla 1. A cada grupo se le suministró una bebida diferente con la

intención de evaluar el efecto fisiológico del prototipo (grupo lúpulo) frente a un control negativo (grupo control) y un control positivo (grupo vino).

Tabla 1. Grupos experimentales (n=8) y características de las bebidas

Grupo	Glucosa	Etanol	Antioxidantes
Control	X		-----
Vino		X	7 equivalentes Trolox
Lúpulo		Trazas	14 equivalentes Trolox

Los animales recibieron en el agua de bebida los distintos productos en cantidad equivalente a la de un consumo de etanol moderado en el hombre (300 mL/día - 70 kg) (1.07 mL/animal/día). Los biberones se prepararon a diario y los animales tuvieron libre acceso a la bebida. Durante la primera semana se valoró diariamente la ingesta líquida de la unidad experimental (jaula) para la verificación de cualquier incremento o descenso de la misma. De esta manera, el grupo Control tomó una solución azucarada (5.9 g/L), el grupo denominado “Vino” consumió vino con 12 % etanol (v/v) y una actividad antioxidante de 7 equivalentes de Trolox, mientras que el denominado “Lúpulo” tomó vino desalcoholizado (1.1 % v/v) con extracto de lúpulo (50 mL/L vino desalcoholizado) con una actividad antioxidante de 14 equivalentes de Trolox. El contenido calórico fue similar para las tres bebidas.

Dieta: los animales recibieron durante el estudio y simultáneamente a la administración de las distintas bebidas, una dieta enriquecida en colesterol (2 %) “*ad libitum*”.

Tiempo de estudio: Los animales se mantuvieron con el tratamiento durante 12 semanas.

2.3. Obtención de muestras

Tras el periodo de adaptación los animales siguieron el tratamiento durante 12 semanas. Posteriormente fueron sacrificados por exanguinación mediante punción intracardíaca y posterior administración de KCl (1M) bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Forane®) al 2 %. Se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero y plasma. La sangre recogida mediante punción intracardíaca fue transferida a tubos con ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y Gelatina (bioquímica) (6 mL). Mediante centrifugado (4.000 rpm durante 10 min) se obtuvo plasma.

A su vez, se diseccionaron los animales y se obtuvieron las aortas completas, muestras de corazón, hígado, riñón y tejido adiposo (grasa retoperitoneal). Todos los tejidos fueron lavados, codificados e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Los posteriores análisis se realizaron en condiciones “ciegas”.

2.4. Parámetros a determinar

2.4.1. Perfil lipídico

Las concentraciones en plasma de triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas HDL y LDL fueron determinadas por métodos enzimáticos utilizando un auto-analizador (Hitachi, Tokyo, Japón). Las concentraciones de ácidos grasos libres fueron analizadas mediante el Kit de Roche (Catalog No. 11383175001), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.2. Determinación de la Peroxidación Lipídica

Una vez realizado el homogenado del tejido se procedió a la evaluación del estado redox de la muestra mediante la valoración de la peroxidación lipídica. Los peróxidos de lípidos, procedentes de los ácidos grasos poliinsaturados son inestables y se descomponen dando lugar a una serie de compuestos, entre los cuales se incluyen los compuestos carbonilo reactivos como el malondialdehído (MDA). El MDA reacciona

con el ácido tiobarbitúrico a temperaturas de 90-100°C y medio ácido, produciendo compuestos conocidos como las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), detectables colorimétricamente a 530-540 nm (Kit TBARS N° #10009055. Cayman Chemical, Michigan, EEUU). Se procesaron homogenados de tejido (25 mg de tejido) o plasma según las instrucciones del fabricante y los resultados de la muestra procesada se midieron con un espectrofotómetro (Genesys 10 uv, Thermo Scientific, Waltham, Massachussets, EEUU) a 530-540 nm.

2.4.3. Actividad enzimática Óxido Nítrico Sintetasa (NOS)

La actividad de la enzima NOS se determinó en los homogeneizados de tejido arterial y cardíaco cuantificando la cantidad de nitratos y nitritos que origina la conversión de arginina en citrulina. Para ello se utilizó el método de la reacción de Griess, modificado, utilizando el kit de ensayo colorimétrico para nitritos y nitratos de Cayman (Catalog No. 760871). En resumen, cada muestra de tejido se homogeneizó en PBS, con ultrasonidos a baja temperatura, y los sobrenadantes se incubaron en una solución de NADPH (1M) y nitrato reductasa, transformando los nitritos en nitratos, durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se incubaron con el reactivo de Griess durante 10 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Biotek Instruments, Inc., Vermont, EEUU), y los resultados se expresaron como μ moles de nitritos más nitratos por gramo de proteína, utilizando nitrito para la curva patrón.

2.5. Estudio estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm SD. Para la comparación de los datos se empleó el análisis de la varianza (ANOVA), y los análisis no paramétricos (Mann–Whitney y Kruskal–Wallis) para muestras no relacionadas con un nivel de significación de $p \leq 0.1$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS, versión 11.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIOS IN VITRO

1.1. Citotoxicidad del extracto de lúpulo

Se determinó la citotoxicidad del extracto de lúpulo en macrófagos THP-1, según se detalla en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos. Los resultados de esta citotoxicidad se muestran en la figura 1.

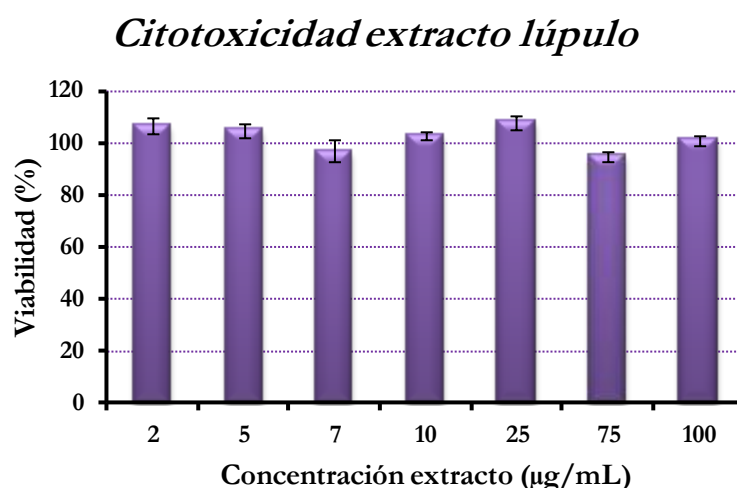


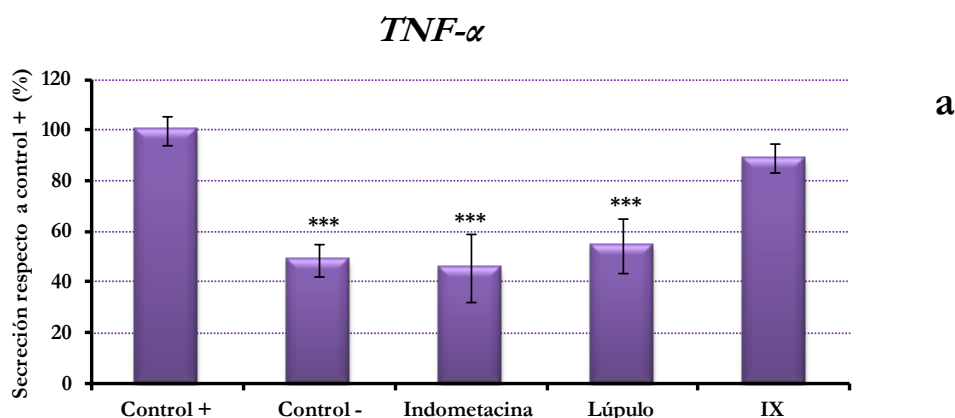
Figura 1. Efecto del extracto de lúpulo, obtenido por SWE a 150°C, en la viabilidad celular de macrófagos THP-1 a diferentes concentraciones en el medio de cultivo.

Se añadieron diversas concentraciones de extracto para comprobar cómo afectaba éste a la viabilidad de las células. Tras la incubación de las células con el extracto durante 24 h se observó que ninguna de las concentraciones ensayadas causaba toxicidad a las células. Por tanto, se puede ver que cualquiera de estas concentraciones era adecuada para determinar la bioactividad del extracto de lúpulo obtenido mediante SWE a 150°C.

1.2. Actividad antiinflamatoria del extracto de lúpulo

La determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto de lúpulo se realizó midiendo la secreción de las citoquinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 (proinflamatorias) e IL-10 (antiinflamatoria). En el modelo *in vitro* de inflamación mediada por la oxidación de las LDL, inicio del proceso aterogénico, se probaron distintas concentraciones no citotóxicas del extracto de lúpulo en células activadas con ox-LDL. Tras ensayar concentraciones del extracto de lúpulo desde 2 hasta 100 $\mu\text{g/mL}$, se determinó como concentración más adecuada para el ensayo la de 10 $\mu\text{g/mL}$ (datos no mostrados). Concentraciones superiores a ésta desencadenaban en las células una potenciación del efecto inflamatorio, mientras que las menores, no tenían efecto alguno.

En este estudio se utilizó Indometacina (antiinflamatorio no esteroideo en dosis farmacológicas) como indicador de reducción de la inflamación, extracto de lúpulo obtenido mediante SWE a 150°C e IX puro en una cantidad equivalente a la contenida en 10 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de lúpulo. Como control positivo de inflamación las células se activaron adicionando en el medio ox-LDL, mientras que el control negativo consistía en medio de cultivo. Tras el tratamiento de 24 h se determinó la secreción de citoquinas en el medio de cultivo mediante la técnica ELISA, con los resultados mostrados en la figura 2.



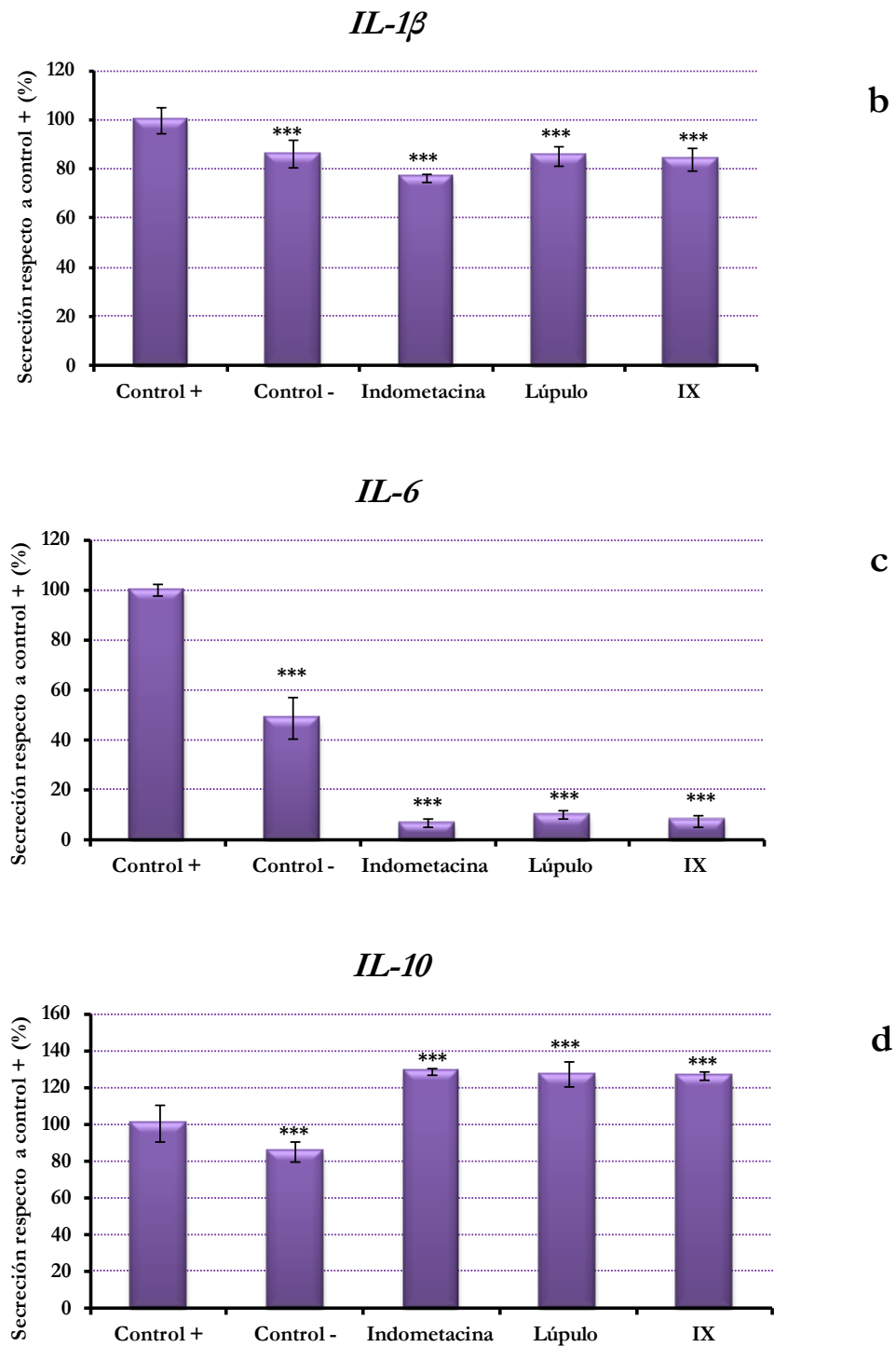


Figura 2. Secreción de TNF- α (a), IL-1 β (b), IL-6 (c) y IL-10 (d), tras 24 hde tratamiento. Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar) en 6 experimentos independientes con 3 réplicas. La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.05$, ** Valor de $P < 0.01$, *** Valor de $P < 0.001$, con respecto al control +. Control +: 75 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL, control -: medio de cultivo, Indometacina: 5 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL, Lúpulo: 10 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL, IX: 0.0234 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL (cantidad equivalente a la contenida en 10 $\mu\text{g/mL}$).

La secreción de $\text{TNF-}\alpha$ en los tratamientos control positivo con respecto al control negativo se incrementó alrededor del 50 %, debido a la activación del proceso inflamatorio por ox-LDL. El tratamiento con el fármaco Indometacina disminuyó la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ hasta niveles similares a los del control negativo. Resultados muy similares se obtuvieron con la adición del extracto de lúpulo. Sin embargo, el patrón de IX no provocó una disminución significativa en la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 3a).

Tras el tratamiento con las ox-LDL, la secreción de $\text{IL-1}\beta$ aumentó menos de un 20 %, con respecto al control negativo. Por el contrario, en los ensayos con Indometacina, extracto de lúpulo e IX, esta secreción disminuyó significativamente. No obstante, cabe destacar que esta disminución no fue muy acusada (alrededor del 20 %) (Figura 3b).

La secreción de IL-6 , después de la adición de ox-LDL aumentó más de un 50 %. En contraposición, los tratamientos con Indometacina, extracto de lúpulo e IX fueron capaces de disminuir la secreción hasta niveles muy por debajo de los obtenidos en el control negativo (Figura 3c).

Al igual que en el resto de citoquinas, la secreción de IL-10 se incrementó tras la adición de ox-LDL. Sin embargo en este caso, los tratamientos de Indometacina, extracto de lúpulo e IX también dieron lugar a un aumento en la secreción. Este incremento fue de un 25 % para los tres casos (Figura 3d).

Según los resultados obtenidos, el extracto de lúpulo fue capaz de disminuir la secreción de todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6) y de aumentar la de la antiinflamatoria (IL-10). En comparación con el patrón puro de IX, el extracto de lúpulo tiene un mayor efecto, posiblemente debido a que en el extracto de lúpulo, además de IX hay XN, 8-PN y otros polifenoles con actividad antiinflamatoria.

Según datos bibliográficos, polifenoles procedentes de extractos de lúpulo inhiben la expresión génica de la enzima COX-2 y citoquinas proinflamatorias como IL-6 , en células del epitelio gingival (Kou y col., 2008).

Dentro de los polifenoles, se ha demostrado que los prenilflavonoides presentes en el lúpulo poseen actividad antiinflamatoria, ya que disminuyen la producción de IL-6 ,

entre otras citoquinas proinflamatorias, en un modelo celular de macrófagos THP-1 activados mediante inflamación inespecífica, con lipopolisacárido bacteriano (Peluso y col., 2010). Aparte de esta actividad antiinflamatoria, se ha descrito una actividad antiproliferativa para este tipo de compuestos presentes en el lúpulo (Delmulle y col., 2006).

El XN, uno de los prenilflavonoides más abundantes en el extracto de lúpulo estudiado, es capaz de inhibir la producción de IL-1 β , TNF- α y NO, al incorporar 0.5, 1.0 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de este compuesto en el medio de cultivo de macrófagos RAW 264.7 (Cho y col., 2008). Lupinacci y col. (2009) corroboran el efecto del XN en la reducción de la secreción de TNF- α en el mismo modelo celular. Además Cook y col. (2010) han demostrado la capacidad anticancerígena de este compuesto en células tiroideas a una dosis de 30 $\mu\text{mol/L}$. Asimismo, se ha visto que el XN tiene efectos antiproliferativos en las células tumorales del hígado (Ho y col., 2008).

Existen menos estudios sobre el derivado del XN, el IX, aunque se ha descrito actividad antiproliferativa en células tumorales de pecho, ovario y colon con un efecto dosis-dependiente de 0.1-100 μM (Miranda y col., 1999). Esta actividad también la corroboran Gerhäuser y col. (2002), además de demostrar su capacidad para inhibir la producción de iNOS y COX-1, enzimas relacionadas con la progresión del proceso inflamatorio.

Otro de los prenilflavonoides, la 8-PN, reduce significativamente la liberación de TNF- α y NO al tratar células RAW 264.7 con 30 μM de este compuesto durante una hora (Paoletti y col., 2009).

Los ácidos amargos del lúpulo son otros de los compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria demostrada. Van Cleemput y col. (2009) observaron una disminución en la producción de TNF- α e IL-6, así como una inhibición en la activación de los factores de transcripción NF- κB y AP-1 (Apoproteína-1). Uno de estos ácidos es el α -ácido humulona, compuesto capaz de inhibir la expresión de COX-2 en la piel de ratón, mediante el bloqueo de la activación de NF- κB y AP-1 (Lee y col., 2007).

El extracto de lúpulo posee actividad antiinflamatoria, actividad proporcionada no sólo por el IX presente en el lúpulo, sino también por otros compuestos fenólicos, ya que el patrón puro de IX tiene una actividad antiinflamatoria menor que el extracto de

lúpulo. La disminución del proceso inflamatorio causada por el extracto de lúpulo es similar a la que presenta la Indometacina con la mitad de concentración. Esto demuestra que a pesar de la interesante actividad antiinflamatoria del extracto de lúpulo, no es comparable con la de un fármaco.

Puesto que en el modelo celular utilizado se activaron las células con ox-LDL, el extracto de lúpulo tiene actividad antiinflamatoria específica, ya que está mediada por éstas. Este tipo de inflamación se da al inicio de la formación de la placa de ateroma (Ross, 1999). Por tanto, estos extractos de lúpulo podrían ser incorporados a los alimentos aportando a éstos propiedades antiaterogénicas.

2. ESTUDIOS IN VIVO

Tal y como se ha indicado, para todos los estudios *in vivo* se establecieron tres grupos: un grupo Control, al que se le proporcionó una solución azucarada como suplemento; un segundo grupo, al que se denominó Vino, debido al suplemento en su dieta con vino con un 12 % (v/v) etanol; por último, un tercer grupo, denominado Lúpulo, cuya dieta se suplementó con vino desalcoholizado (1 % (v/v) etanol) y extracto de lúpulo (50 mL/L vino). Los resultados de los estudios que se llevaron a cabo se muestran a continuación:

2.1. Parámetros físicos

Los animales fueron pesados antes y después del estudio, transcurriendo entre ambas medidas un periodo de 12 semanas. Se calculó la diferencia de peso de los animales y tras el análisis de la varianza de este parámetro después del tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Similares resultados se obtuvieron al comparar el peso de la grasa retroperitoneal, parámetro en el que tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos.

2.2. Marcadores del perfil lipídico y del metabolismo de la glucosa

2.2.1. Perfil lipídico

Tras la determinación de la concentración de colesterol total se obtuvieron los datos que se muestran en la figura 3. Como se puede observar, el grupo tratado con vino presentó unos valores significativamente inferiores a los del grupo Control. Aunque en el grupo Lúpulo también existía una pequeña disminución, no llegó a ser estadísticamente significativa.

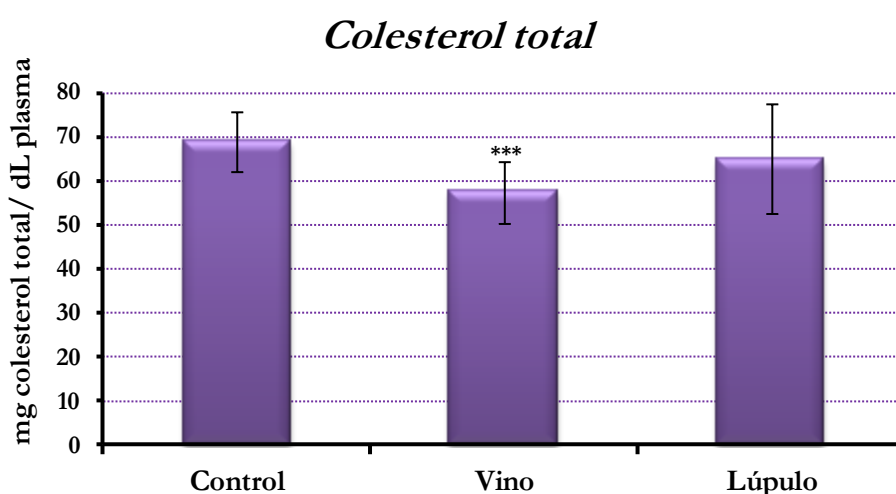


Figura 3. Concentraciones de colesterol plasmático tras el tratamiento (mg/dL). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

La determinación de la concentración de LDL, HDL, así como la relación LDL/HDL mostró ausencia de diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas tras la determinación de la concentración de triglicéridos. Tanto para el grupo Vino como para el Lúpulo se observó un descenso en el nivel de triglicéridos (Figura 4).

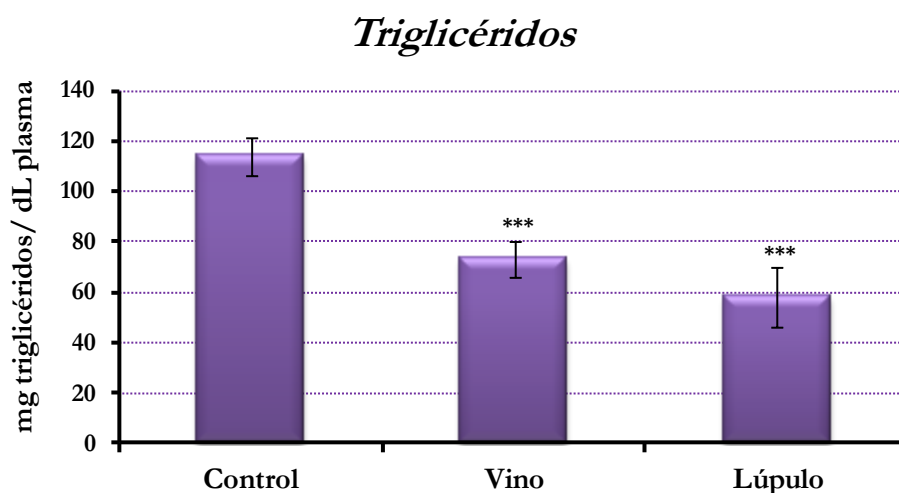


Figura 4. Concentraciones de triglicéridos tras el tratamiento (mg/dL). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

2.2.2 Metabolismo de la glucosa

En la figura 5 se muestran los resultados procedentes de la determinación de glucosa en sangre. Únicamente se encontraron diferencias significativas en el grupo Vino con respecto al Control (95.3 mg/dL frente a 116.2 mg/dL). Por el contrario, el grupo Lúpulo no mostró ninguna diferencia respecto al grupo suplementado solamente con una solución azucarada.

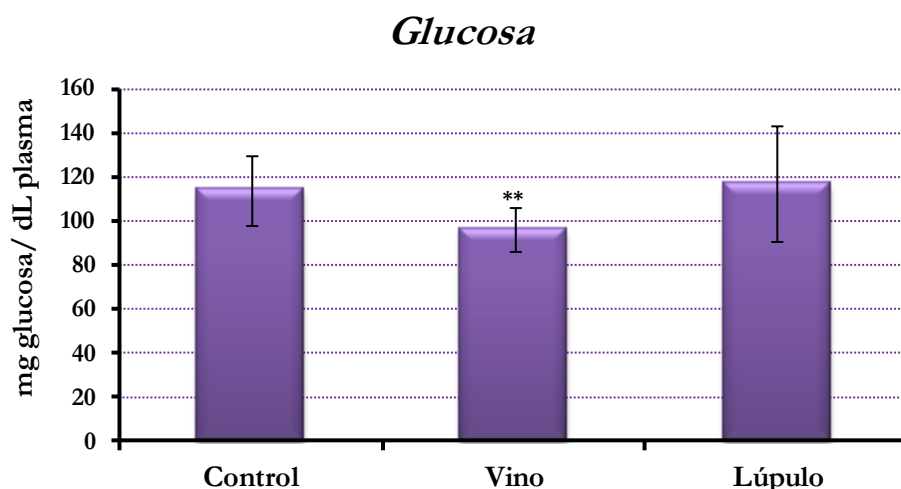


Figura 5. Concentraciones de glucosa tras el tratamiento (mg/dL). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

Los niveles de triglicéridos totales tanto en el grupo Vino como en el grupo Lúpulo disminuyeron. Sin embargo, tanto los niveles de colesterol total como las concentraciones de glucosa plasmática solo se vieron disminuidas en el caso del grupo Vino, ya que el grupo Lúpulo no presentó diferencia significativa respecto del grupo Control. Esta reducción en los niveles de colesterol total en el grupo Vino es similar a la determinada por Gorinstein y col. (1998a), en un modelo de ratas Wistar, con una alimentación suplementada con vino durante 4 semanas. Por otro lado, Ghiselli y col. (2000) determinaron en un estudio en humanos, con una bebida desalcoholizada, rica en lúpulo (cerveza desalcoholizada) que no existían diferencias significativas transcurridas 2 h desde la ingesta de la bebida en los niveles de colesterol total, triglicéridos y glucosa en sangre. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, salvo en el caso de los niveles de triglicéridos, ya que disminuían tras la suplementación con la bebida funcional. Esto puede ser debido al incremento en el tiempo de ensayo, o más probablemente a que la bebida funcional, aparte de lúpulo está compuesta por vino desalcoholizado. Tal y como demuestran Stoker y O'Halloran (2004), el vino desalcoholizado disminuye los niveles de triglicéridos en sangre tras suplementar la dieta de ratones deficientes en apolipoproteína E (enzima

cuya deficiencia causa el incremento de los niveles de colesterol y triglicéridos) con esta bebida.

Por otro lado, la relación de LDL/HDL no se vio modificada por la adición de vino o vino desalcoholizado y lúpulo, mostrando unos valores similares a los del grupo Control. Otro estudio realizado sobre un modelo animal en hamster con una dieta rica en colesterol suplementada con vino, cuya concentración en etanol fue un 50 % inferior a la de nuestro estudio, demostró que la relación LDL/HDL también se mantenía (Vinson y col., 2001). En cambio, Gorinstein y col. (1998b) observaron una disminución en esta relación, tras el tratamiento de ratas con extractos liofilizados de vino y cerveza. Asimismo, estos autores encontraron que ambas bebidas disminuían los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos, demostrando así sus efectos cardiosaludables tras la incorporación en la dieta.

2.3. Niveles de peroxidación lipídica

En este estudio se han analizado de manera global los peróxidos lipídicos como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico y se ha utilizado malondialdehído (MDA) como patrón interno y realización de rectas de calibrado. Los resultados de los experimentos se expresaron en μmol de equivalentes de MDA por mg de proteína (en tejidos) o mL (en caso del plasma). Sin embargo, no se han de considerar los resultados como concentraciones de MDA, sino como concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, ya que este ensayo no es específico de MDA.

Para determinar el efecto de las bebidas añadidas en la dieta, en el estado oxidativo global del modelo animal, se analizaron las concentraciones de equivalentes de MDA en el plasma de los grupos estudiados, tras 12 semanas de tratamiento. En los datos obtenidos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (datos no mostrados).

Por el contrario, se encontraron diferencias significativas al analizar el efecto de la bebida enriquecida en lúpulo en los niveles de peroxidación lipídica de órganos grasos, como se resumen en las figuras 6, 7 y 8.

A la finalización del estudio, los niveles de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico en los homogenados hepáticos obtenidos disminuyeron significativamente en los animales del grupo Lúpulo (3.15 $\mu\text{mol MDA/mg proteína}$), con respecto a los Controles (4.04 $\mu\text{mol MDA/mg proteína}$). Sin embargo, el grupo Vino no mostró diferencia significativa alguna (Figura 6).

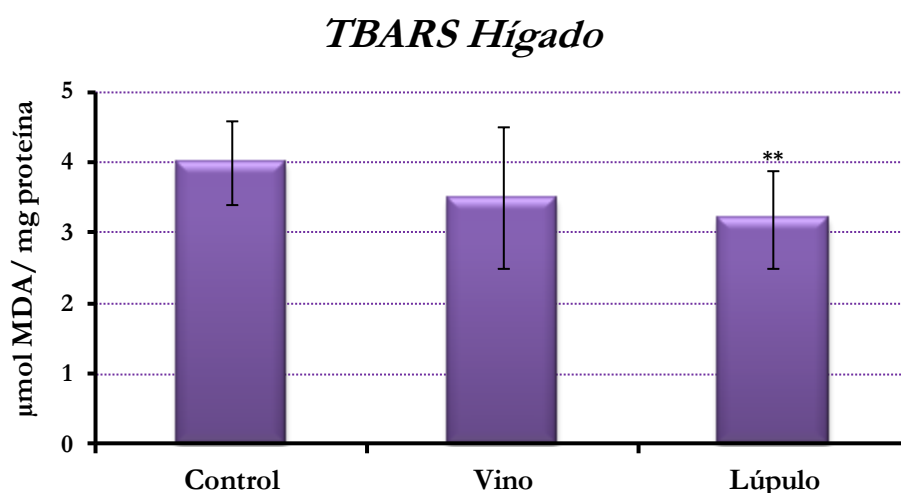


Figura 6. Concentraciones de peróxidos hepáticos tras el tratamiento ($\mu\text{moles MDA/mg proteína}$). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

En la figura 7 se puede observar que tras el tratamiento con vino y vino desalcoholizado con lúpulo, los niveles de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico en homogenados renales disminuyeron significativamente. Esta disminución fue mayor en el caso de los animales suplementados con lúpulo (4.86 frente a 4.19 $\mu\text{mol MDA/mg proteína}$).

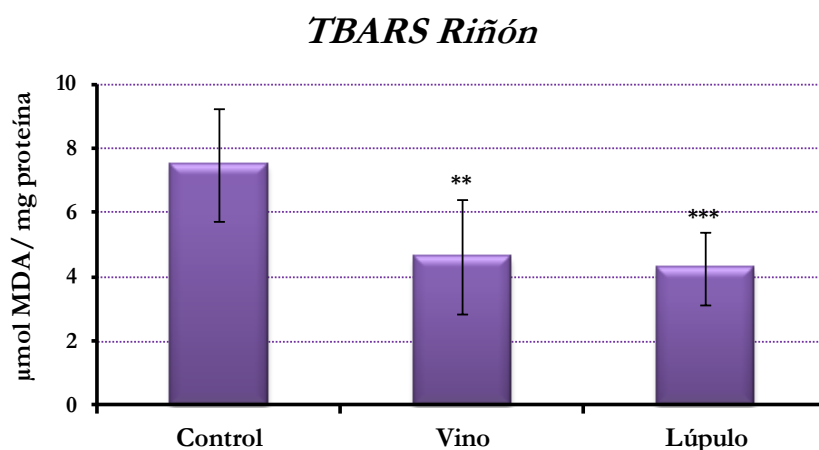


Figura 7. Concentraciones de peróxidos renales tras el tratamiento (μmoles MDA/mg proteína). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

Los resultados mostrados en la figura 8 indican que tanto el suplemento de vino desalcoholizado con extracto de lúpulo como el de vino con alcohol presentó diferencias significativas, disminuyendo el contenido de peróxidos de la grasa peritoneal (homogenados de tejido adiposo).

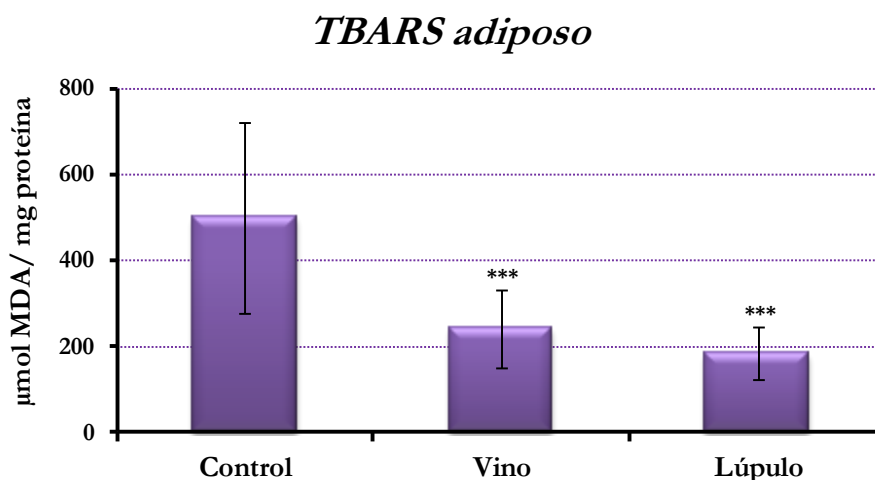


Figura 8. Concentraciones de peróxidos en tejido adiposo tras el tratamiento (μmoles MDA/mg proteína). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

De los datos obtenidos relacionados con los niveles de peroxidación lipídica se determinó que las concentraciones de equivalentes de MDA de órganos grasos y tejido adiposo disminuyeron en todos los casos en los que se suplementó la bebida con lúpulo, mientras que en el grupo Vino estas concentraciones se redujeron en el caso del riñón y del tejido adiposo pero no en el del hígado. Debido a la limitada bibliografía en cuanto a estudios *in vivo* del lúpulo, que determinen este parámetro, se han comparado los resultados obtenidos con datos de estudios *in vitro*. En el estudio *in vitro* de Rodríguez y col. (2001), se determinó que compuestos prenilados presentes en el lúpulo, inhibían la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata. Asimismo, Olas y col. (2011) observaron la capacidad antioxidante del lúpulo para modular el estrés oxidativo en un cultivo plaquetario humano.

En contraposición, sí se han encontrado estudios *in vivo* referentes al vino desalcoholizado, como el estudio de Rodrigo y col. (2005), que no hallaron diferencias significativas al medir la concentración de equivalentes de MDA en riñón e hígado de ratas cuya dieta fue suplementada con vino desalcoholizado. Estos resultados no se correspondieron con los nuestros, debido probablemente al sinergismo con el extracto de lúpulo. Otros estudios en vinos desalcoholizados concluyen que su suplemento en la dieta de personas fumadoras tiene un efecto beneficioso en la peroxidación lipídica (Cacceta y col., 2001). Vinson y col. (2001) determinaron también que el vino desalcoholizado disminuía el nivel de peróxidos en plasma utilizando un modelo de hámster.

En cuanto al estado oxidativo global determinado midiendo la concentración de equivalentes de MDA en el plasma, en ninguno de los grupos de estudio se encontraron diferencias significativas. No se han encontrado resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio en plasma, sin embargo, Fuhrman y col. (1995) observaron que, tras una semana de suplementación con vino en voluntarios sanos, no existía diferencia significativa en la concentración de equivalentes de MDA en el plasma, pero sí después de 2 semanas de tratamiento.

2.4. Producción de óxido nítrico

Como medida indirecta del óxido nítrico, se determinaron las concentraciones de nitritos y nitratos totales en homogenados de aorta y corazón de los animales de experimentación.

En cuanto a las concentraciones de $\text{NO}^{2-} + \text{NO}^{3-}$ en el tejido cardíaco, no se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos estudiados (datos no mostrados).

En cambio, cuando se analizó la concentración de éstos en el tejido aórtico tras el tratamiento, se observaron diferencias significativas entre los grupos. En concreto, como se muestra en la figura 9, el grupo tratado con vino presentó unos valores significativamente superiores ($105.0 \mu\text{mol NO}^{2-} + \text{NO}^{3-}/\text{mg proteína}$) en aorta comparados con el grupo Control ($57.3 \mu\text{mol NO}^{2-} + \text{NO}^{3-}/\text{mg proteína}$). Diferencias que no se presentaron en el grupo suplementado con vino desalcoholizado y lúpulo.

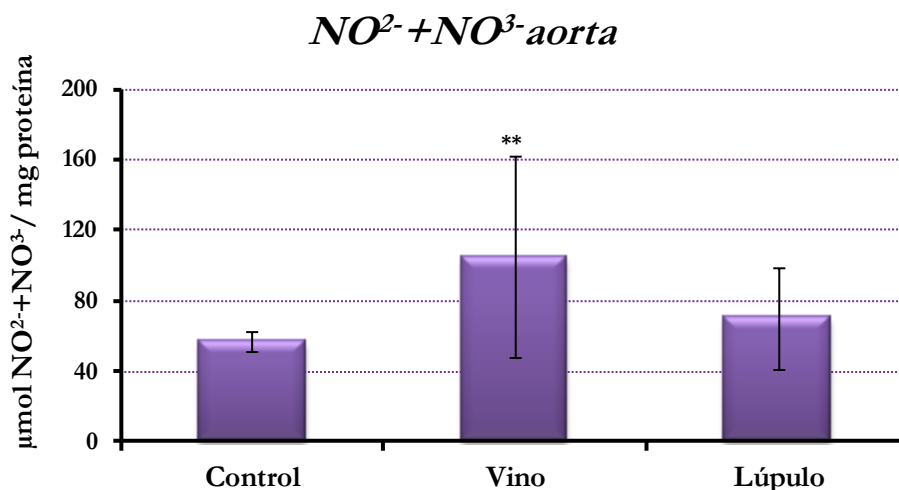


Figura 9. Concentraciones de nitritos y nitratos en la aorta tras el tratamiento ($\mu\text{moles MDA}/\text{mg proteína}$). Los valores obtenidos representan la media \pm SD (Desviación estándar). La significación estadística viene representada por los siguientes valores de P: * Valor de $P < 0.1$, ** Valor de $P < 0.05$, *** Valor de $P < 0.01$, con respecto al grupo control. Control: 5.9 g/L de solución azucarada; Vino: vino 12 % etanol; Lúpulo: vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

El incremento observado en la producción total de NO en aorta en los animales del grupo Vino, se puede deber a la presencia de etanol y compuestos fenólicos en esta suplementación. Diversos estudios demuestran el efecto vasodilatador de ambos como consecuencia de este incremento (Rocha y col., 2012; Baraona y col., 2002; Andriambeloson y col., 1997). Según Barahona y col. (2002), el efecto vasodilatador del etanol se debe, principalmente, a la activación de la NO sintasa endotelial (eNOS) y tras un consumo habitual de alcohol, a una inducción de la iNOS.

En cuanto al grupo Lúpulo la ausencia de diferencias significativas respecto del grupo Control pudo ser debida a la ausencia casi total de etanol en la bebida o a un posible sinergismo entre los compuestos de ambas bebidas. Andriambeloson y col. (1997) vieron cómo los polifenoles del vino incrementan la producción de NO en anillos aórticos de rata, en los que previamente se indujo la vasoconstricción utilizando noradrenalina.

El posible incremento que ejerzan los polifenoles del vino puede ser contrarrestado con la presencia de lúpulo, capaz de disminuir la producción de NO al inhibir la expresión de iNOS (Zhao y col., 2003).

CONCLUSIONES
FINALES

CONCLUSIONES FINALES

En lo que se refiere al **objetivo general** del presente trabajo de Tesis Doctoral, definido en su momento como “Contribución a la metodología y procedimientos para el diseño de una bebida cardiosaludable obtenida a partir de vino”, se puede establecer la siguiente **conclusión general**:

La selección de la materia prima por variedades, en función de su capacidad antioxidante, en combinación con el empleo de técnicas de desalcoholización capaces de preservar dicha actividad, permiten elaborar bebidas con actividad antioxidante y antiinflamatoria de clara proyección cardiosaludable y notas sensoriales evocadoras de vino.

En cuanto a los **objetivos específicos** del trabajo, se pueden extraer las siguientes **conclusiones**:

1.- Sobre el objetivo de estudiar la actividad antioxidante de diferentes variedades de uva con el fin de seleccionar las más idóneas para elaborar vinos de alta actividad biológica.

La elección de la variedad de uva en función de su actividad biológica potencial es esencial en el procedimiento de obtención de bebidas funcionales a partir de vino.

Concretamente, la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de uva obtenidos por maceración etanólica acelerada es un procedimiento útil para la selección de variedades por su potencial actividad biológica ya que permite su comparación y clasificación diferenciada.

Las variedades Chenin blanc, Chardonnay, Garnacha blanca y Viognier son adecuadas para la elaboración de una bebida funcional con similitudes a los vinos blancos mientras que las variedades Mencía y Belsa permiten obtener una bebida funcional de similitud organoléptica con un vino tinto.

La elevada correlación existente entre los datos de actividad antioxidante obtenidos por el método DPPH y el índice de polifenoles totales confirma que utilizar ambos como métodos rápidos (o de screening) en la selección de variedades de uva con mayor capacidad antioxidante es una opción de utilidad real.

2.- Sobre el objetivo de estudiar procedimientos de reducción del contenido en etanol del vino que afecten lo menos posible a sus características sensoriales.

La tecnología de fluidos supercríticos es adecuada para la de elaboración de una bebida funcional a partir de vino porque permite reducir el contenido en etanol por debajo de los límites legales sin deteriorar la actividad biológica y manteniendo apreciablemente las propiedades sensoriales características del vino.

Tanto la tecnología de ósmosis inversa como la de fluidos supercríticos permiten reducir el grado alcohólico por debajo del 1% (v/v). La primera de ellas es más efectiva cuando se aplica en modo de diafiltración discontinua por reducción de volumen, comenzando con diluciones secuenciales.

La tecnología de fluidos supercríticos ofrece una mayor recuperación de aromas que la osmosis inversa, por lo que resulta más adecuada para la elaboración de una bebida funcional a partir de vino, si se trata de mantener una cierta analogía a las características sensoriales del mismo.

3.- Sobre el objetivo de estudiar procedimientos de obtención de extractos de lúpulo ricos en polifenoles complementarios a los que contiene el vino.

La potenciación de la actividad biológica del vino mediante la adición de polifenoles exógenos requiere un incremento en el número de tecnologías de elaboración de la bebida funcional, por lo que su conveniencia quedará delimitada por los costes adicionales que ello suponga.

Concretamente, el enriquecimiento en polifenoles de una bebida funcional a base de vino, se puede conseguir mediante la adición de un extracto de lúpulo rico en isoxanthohumol obtenido con agua sobrecalentada y presurizada en condiciones subcríticas, técnica significativamente más selectiva y eficiente que los procedimientos que utilizan etanol en condiciones subcríticas o las extracciones secuencias con diferentes disolventes.

4.- Sobre el objetivo de perfeccionar la metodología analítica para la caracterización química de los componentes bioactivos de los productos en estudio.

El procedimiento de obtención de una bebida funcional a partir de vino requiere de un soporte analítico validado, tanto química como funcionalmente. Para el primer aspecto, se han desarrollado dos métodos de análisis mediante HPLC que permiten la obtención de una visión global de la composición fenólica, así como la identificación no sólo de procianidinas y ácidos, sino también de compuestos de tipo flavonoles, antocianos y estilbenos, en una única elución.

Concretamente, la evaluación cualitativa del perfil de polaridades de compuestos fenólicos de extractos y vinos proporciona una herramienta útil para la caracterización de la materia prima.

A su vez, la caracterización química del producto final requiere de una validación específica mediante esta técnica cromatográfica, para lo que se ha desarrollado otro método que permite la caracterización de procianidinas, ácidos, flavonoles, antocianos y estilbenos en una sola elución por HPLC.

5.- Sobre el objetivo de realizar una evaluación preliminar de la actividad cardiosaludable potencial de un modelo de bebida diseñada según las herramientas desarrolladas en el presente trabajo de Tesis Doctoral con el fin de realizar una aproximación a la validación de dichas herramientas.

La caracterización funcional del producto final requiere la implementación de técnicas de valoración *in vitro* e *in vivo* como parte del procedimiento metodológico; la adecuación a la normativa de comercialización determinará las etapas posteriores.

La utilización de macrófagos humanos diferenciados a partir de la línea celular de monocitos tipo THP-1 ha permitido evaluar la actividad antiinflamatoria de la bebida funcional proporcionando información sobre sus potenciales efectos saludables; por tanto resulta de especial interés como método de control en el proceso de elaboración.

El extracto de lúpulo obtenido en condiciones subcríticas reduce la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, e incrementa la citoquina antiinflamatoria IL-10 en modelos *in vitro*, por lo que se validan sus propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas

Según ensayos en animales de experimentación, la ingesta controlada de la bebida funcional produce una disminución en la concentración plasmática de triglicéridos y ejerce un efecto antioxidante asociado los órganos grasos y por tanto tiene un efecto saludable potencial.

Aunque la operación de extracción de compuestos fenólicos del lúpulo incrementa los costes de producción de la bebida funcional, la aportación de polifenoles complementarios a los del vino potencia la actividad biológica de la bebida.

Por tanto, en relación con la hipótesis y planteamiento inicial del presente trabajo de Tesis Doctoral, se considera que una bebida obtenida a partir de vino desalcoholizado hasta una cantidad residual de etanol y enriquecida con prenilflavonoides de lúpulo, puede ser un producto alimenticio de uso específico para la salud, cuyo consumo pautado y continuado podría ejercer un papel positivo en la reducción del riesgo cardiovascular.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abou-Agag, L.H.; Khoo, N.K.; Binsack, R.; White, C.R.; Darley-USmar, V.; Grenett, H.E.; Booyse, F.M.; Digerness, S.B.; Zhou, F.; Parks, D.A. 2005. Evidence of cardiovascular protection by moderate alcohol: role of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 39: 540-548.

Akçay Y.D.; Yildirim H.K.; Güvenc U.; Sözmen E.Y. 2004. The effects of consumption of organic and nonorganic red wine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans. *Nutrition Research*. 24: 541-554.

Alén-Ruiz, F.; García-Falcón, M.S.; Pérez-Lamela, M.C.; Martínez-Carballo E.; Simal-Gándara, J. 2009. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem*. 11: 53-60.

Alonso, A.M.; Guillén, D.A.; Barroso, C.G.; Puertas, B.; García, A. 2002. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Agric. Food Chem*. 50: 5832-5836.

Ames, B.N.; Gold, L.S.; Willet, W.C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 5258-5265.

Andriambeloson, E.; Kleschyov, A.L.; Muller, B.; Beretz, A.; Stoclet, J.C.; Andriantsitohaina, R. 1997. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol*. 120: 1053-1058.

Anklam, E.; Berg, H.; Mathiasson, L.; Sharman, M.; Ulberth, F. 1998. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. *Food Additives and Contaminants*. 15:729-750.

Anónimo. 1993. Inhibition of LDL oxidation by phenolic substances in red wine: a clue to the French paradox. *Nutrition Reviews*. 51: 185-187.

Aron, P. M.; Kennedy, J. A. 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res*. 52: 79-104.

Aubert, S.; Poux C. 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. *Ann. Technol. Agric.* 18 (2): 93-109.

Auroma, O.I. 1994. Nutrition and Health Aspects of Free Radicals and Antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 32: 671-683.

Baena Díez, J.M.; Del Val García, J.L.; Tomàs Pelegrina, J.; Martínez Martínez, J.L.; Martín Peñacoba, R.; González Tejón, I.; Raidó Quintana, E.M.; Pomares Sajkievicz, M.; Altés Boronat, A.; Álvarez Pérez, B.; Piñol Forcadell, P.; Rovira España, M.; Oller Colom, M. 2005. Cardiovascular Disease Epidemiology and Risk Factors in Primary Care. *Revista Española de Cardiología.* 58: 367-73.

Baiano, A.; Terracone, C.; Gambacorta, G.; La Notte, E. 2009. Phenolic content and antioxidant activity of Primitivo wine: Comparison among winemaking technologies. *J. Food Sci.* 74 (3): 258-267.

Baldwin G. 1998. Reverse osmosis and its future relevance to the wine industry. *Aust NZ Grapegrow Winemak* 414a: 129-132.

Bandel, W.; Schmitz, F. J.; Ostertag, K.; Garske, F.; Breidohr, G. 1986. Process and apparatus for reduction of alcohol by dialysis in fermented beverages. *US Patent* No. 4581236.

Baraona, E.; Shoichet, L.; Navder, K.; Lieber, C.S. 2002. Mediation by nitric oxide of the stimulatory effects of ethanol on blood flow. *Life Sciences.* 70: 2987-2995.

Barron, D.; Balland, C.; Possety, F.; Ravanel, P.; Desfougères, A. 1996. Prenylflavonoids and membrane permeability. *Acta botanica gallica* 143: 509-520.

Baublis, A.; Spomer, A.; Berber-Jimenez, M.D. 1994. Antocyanin pigments: comparison of extract stability. *J. Food Sci.* 59: 1219-1233.

- Belisario-Sánchez, Y.Y.; Toboada-Rodriguez, A.; Marín-Iniesta, F.; López-Gómez, A.** 2009. Dealcoholised wines by spinning cone column distillation: phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. *J. Agric. Food Chem.* 57 (15): 6770-6778.
- Belleville, J.** 2002. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition.* 18: 173-177.
- Bernal, J.; Martínez García-Mauriño, C.; Reglero, G.; Marín, F.R.; Ibáñez, E.** 2011. Fast screening method to determine hop's phytoestrogens in beer. *Food Anal. Methods.* 4 (3): 416-423.
- Black, P.B.; Garbutt, L.D.** 2002. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Psychosomatic Research.* 52: 1- 23.
- Bogdan, C.; Vodovotz, Y.; Nathan, C.** 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine.* 174 (6): 1549-1555.
- Bogianchini, M.; Cerezo, A.B.; Gomis, A.; López, F.; García-Parrilla, M.C.** 2011. Stability, antioxidant activity and phenolic composition of commercial and reverse osmosis obtained dealcoholised wines. 44: 1369-1375.
- Bourzeix, M.; Dubernet, M.O.; Heredia, N.** 1975. Sur l'extraction de divers constituants phenoliques des raisins et de leurs rafles, Industries alimentaires et agricoles. 9-10: 1057-1063.
- Bourzeix, M.; Weyland D.; Heredia N.** 1986. Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull O.I.V.*, 59: 1171-1254.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.** 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.Wiss. Technol.* 22: 25-30.
- Brignole, E.A.; Andersen, P.M.; Fredenslund, A.** 1987. Supercritical fluid extraction of alcohols from water. *Ind. Eng. Chem. Res.* 26: 254-261.

Brunner, G.; Kreim, K. 1986. Separation of ethanol from aqueous solutions by gas extraction. *German Chemical Engineering*. 9: 246–250.

Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 67: 21-33.

Bui, K.; Dick, R.; Moulin, G.; Galzy, P. 1986. A reverse osmosis for the production of low ethanol content wine, *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (4): 297-300.

Bunzenberger, G.; Marr, R. 1988. Countercurrent high pressure extraction in aqueous systems. En: *Proceedings of the 5th International Symposium on Supercritical Fluids*, vol. 2. Ed. M. Perrut. pp.: 613-618.

Cacace, J.E.; Mazza G. 2007. Pressurized low polarity water extraction of biologically active compounds from plant products. En: *Functional food ingredients and nutraceuticals: processing technologies*. Ed., Shi, J. Taylor and Francis Group, LLC. CRC. pp: 135-155.

Caccetta, R. A.; Croft, K. D.; Beilin, L. J.; Puddey, I. B. 2000. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 67-74.

Cantos, E.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. 2002. Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC-DAD-MS-MS. 50: 5691-5696.

Carrière, A.; Carmona, M.C.; Fernández, Y.; Rigoulet, M.; Wenger, R.H.; Pénicaud, L.; Casteilla, L. 2004. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP 10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem*. 279 (39): 40462-40469.

Casserly, I.P.; Topol, E. 2004. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *The Lancet*. 363 (9415): 1139-1146.

Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Gómez, M.V.; Velders, A.H.; Hermosín-Gutiérrez, I. 2009. Flavonol-O-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. 2009. Agric. Food Chem. 57: 209-219.

Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. 2007. Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. Agric. Food Chem.: 55: 992-1002.

Catarino, M.; Mendes, A. 2011. Dealcoholizing wine by membrane separation processes. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 12: 330-337.

Cerami, A. 1993. Tumor necrosis factor as a mediator of shock, cachexia and inflammation. Blood Purification . 11 (2): 108-117.

Cerdá, B.; Llorach, R.; Cerón, J.J., Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. 2003. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. Eur. J. Nutr. 42: 18-28.

Česlová, L.; Holčapek, M.; Fidler, M.; Drštičková, J.; Líba, J. 2009. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1216: 7249-7257.

Chadwick, L.R.; Pauli, G.F.; Farnsworth, N.R. 2006. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. Phytomedicine. 13: 119-131.

Cheynier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. Am J Clin Nutr. 81: 223S-229S.

Cheynier, V.; Doco, T.; Fulcrand, H.; Guyot, S.; Le Roux, E.; Souquet, J.M.; Rigaud, J.; Moutounet, M. 1997. ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. Analusis. 25 (8): 32-37.

Cheynier, V.; Fulcrand, H. 2003. Analysis of polymeric and proanthocyanidins and complex polyphenols.. En: Method in polyphenol Analysis. Ed. C. Santos-Buelga, and G. Williamson. The Royal Society of chemistry. Cambridge, Inglaterra. pp.: 285-313.

- Cheyrier, V.; Rigaud, J.** 1986a. HPLC Separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (1): 248-252.
- Cheyrier, V.; Rigaud, J.** 1986b. Identification et dosage de flavonols du raisin. *JIEP.* 86: 442-444.
- Chinaud, N.; Broussous, P.; Ferrari, G.** 1991. Application of reverse osmosis to dealcoholisation of wines, *Connais. Vigne Vin.* 25: 245-250.
- Chira, K.; Suh, J.-H.; Saucier, C.; Teissédre, P.-L.** 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytonutrition fondamentale.* 6: 75-82.
- Cho, Y.-C., H. J. Kim, Kim, Y.-J.; Lee, K.Y. Choi, H.J.; Lee, I.-S.; Kang, B.Y.** 2008. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN-gamma and LPS-activated macrophages. *International immunopharmacology* 8 (4): 567-573.
- Cho, Y.-C.; You, S.K.; Kim, H.J.; Cho, C.W.; Lee, I.-S; Kang, B.Y.** 2010. Xanthohumol inhibits IL-12 production and reduces chronic allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* 10: 556-561.
- Chomarat, P.; Banchereau, J.; Davoust, J.; Palucka, A. K.** 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Natural Immunology.* 1 (6): 510-514.
- Cirico, T.L.; Omaye, S.T.** 2006. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology.* 44: 510-516.
- Cochran, F. R.; Finch-Arietta M. B.** 1992. Interleukin-6 can prime THP-1 macrophages for enhanced production of tumor necrosis factor-alpha in response to LPS. *Immunopharmacology.* 23 (2): 97-103.
- Cook, M.R.; Luo, J.; Ndiaye, M.; Chen, H.; Kunnimalaiyaan, M.** 2010. Xanthohumol inhibits the neuroendocrine transcription factor achaete-scute complex-like 1, suppresses proliferation, and induces phosphorylated ERK1/2 in medullary thyroid cancer. *Am. J. Surg.* 199 (3): 315-318.

Criqui, M.H.; Ringel, B.L. 1994. Does diet or alcohol explain the French Paradox? *The Lancet*. 344: 1719-1723.

Dabrio, M.V.; Blanch, G.P.; Cifuentes, A.; Herraiz, M.; Díez-Masa, J.C.; De Frutos, M.; Martínez Castro, I.; Sanz Perucha, J. 2000. Separaciones con fluidos supercríticos. En: *Cromatografía y electroforesis en columna*. Ed. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona. pp.: 187-220.

Dai, J.; Mumper, R.J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.

Dani, C.; Oliboni, L.S.; Vanderlinde, R.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Henriques, J.A.P. 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically -or conventionally- produced grapes. *Food Chem. Toxicol.* 45: 2574-2580.

Darné G.; Madero-Tamargo J. 1979. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides soluble totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. *Vitis*. 18: 221 -228.

Daufin, G.; René, F.; Aimar, P. 1998. Les separations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire, J.L. Multon. Ed., *Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires*, Lavoisier Tec & Doc, París, Francia.

De Beer, D; Joubert, E., Gelderblom; W.C.A., Manley, M. 2003. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 51: 902-909.

De Pascual-Teresa S.; Rivas-Gonzalo, J.C. 2003. Application of LC-MS for the identification of polyphenols. En *Methods in Polyphenol Analysis*. Eds.: Santos-Buelga C and Williamson G. The Royal Society of Chemistry: Cambridge. pp.: 48-62.

Dell Agli, M.; Galli, G.V.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F.; Bosisio, E. 2005. *In vitro* inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1960-1965.

Delmulle, L.; Bellahcène, A.; Dhooge, W.; Comhaire, F.; Roelens, F.; Huvaere, K.; Heyerick, A.; Castronovo, V.; De Keukeleire, D. 2006. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine*. 13 (9-10): 732-734.

Dixon, R. A.; Xie, D.; Sharma, S. B. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research?. *New Phytol*. 165: 9-28.

Du, G.; Li, M.; Ma, F.; Liang, D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chem*. 113: 557-562.

Ector, B. J.; Magee, J. B.; Hegwood, C. P.; Coig, M. J. 1996. Resveratrol concentration in Muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds and wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 47 (1): 57-62.

Escribano Bailón, M.T. 1993. Estudio de la composición flavánica de la semilla de uva. Universidad de Salamanca.

Escribano-Bailón, M.T.; Gutiérrez-Fernández, I.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. 1992. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del país grape seeds. *J. Agric. Food Chem*. 40 :1797-1799

Estruch, R. 2000. Wine and cardiovascular disease. *Food research International*. 33: 219-226.

Fernández de Simón, B.; Cadahia, E.; Conde, E.; García-Vallejo, M.C. 1996. Low molecular weight phenolic compounds in Spanish oak woods. *J. Agric. Food Chem*. 44 (6): 1507-1511.

Fernández-Mar, M.I.; Mateos, R.; García-Parrilla, M.C.; Puertas, B.; Cantos-Villar, E. 2012. *Food Chem*. 130: 797-813.

Fernández-Pachón, M.S.; Villano, D.; Garcia-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. 2004. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chim. Acta*. 513: 113-118.

Finco, T. S. y Baldwin A. S. 1995. Mechanistic aspects of NF- κ B regulation: The emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity*. 3 (3): 263-272.

Fischer, U. 1995. Mass balance of aroma compounds during the dealcoholization of wine: correlation of chemical and sensory data, Tesis Doctoral, Universität Hannover, Alemania.

Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*. 341: 454-457.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P. L. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-894.

Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M. 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 549-554.

Fukumoto, L. R.; Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3597-3604.

Gamse T.; Rogler I.; Marr R. 1999. Supercritical CO₂ extraction for utilization of excess wine of poor quality. *Journal of Supercritical Fluids*. 14: 123-128.

Gazzani, G.; Papetti, A.; Massolini, G.; Daglia, M. 1998. Anti- and prooxidant Activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* 46 (10): 4118-4122.

Gazzinelli, R. T., Oswald I. P., James, S. L., Sher, A. 1992. "IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *Journal of Immunology*. 148 (6): 1792-1796.

Gerhäuser, C.; Alt, A.P.; Klimo, K.; Knauff, J.; Frank, N.; Becker, H. 2002. Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. *Phytochem. Rev.* 1: 369-377.

Ghiselli, A.; Natella, F.; Guidi, A.; Montanari, L.; Fantozzi, P.; Scaccini, C. 2000. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr. Biochem.* 11: 76-80.

Goldberg, D.M.; Yan, J.; NG,E.; Diamandis, E.P.; Karumanchiri, A.; Soleas, G.; Walterhouse, A.L. 1995. A global survey of trans resveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (2): 159-165.

Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. 2007. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis.* 20: 618-626.

Gómez-Plaza E.; Lopez-Nicolas J.M.; Lopez-Roca J.M.; Martinez-Cutillas A. 1999. Dealcoholization of Wine. Behaviour of the Aroma Components during the Process. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie.* 32 (6): 384-386.

Gonthier, M.P.; Donovan, J.L.; Texier, O.; Felgines, C.; Remesy, C.; Scalbert, A. 2003. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine.* 35 (8): 837-844.

Gonzales, A. M. y Orlando R. A. 2008. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutrition and Metabolism.* 5(1): 17.

González-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos-Buelga, C. 2004. Extraction of flavan-3-ol from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta.* 513: 283-289.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Weisz, M.; Halevy, S.; Martin-Belloso, O.; Trakhtenberg, S. 1998a. The influence of alcohol-containing and alcohol-free beverages on lipid levels and lipid peroxides in serum of rats. *J. Nutr. Biochem.* 9: 682-686.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Weisz, M.; Haruenkit, R. 1998b. The influence of dry matter of different alcoholic beverages on lipids, proteins and antioxidant activity in serum of rats. *J. Nutr. Biochem.* 9: 131-135.

Gorissen, H.; Bellink, C.; Vancraenenbroeck, R.; Lontie, R. 1968. Separation and identification of (+)-gallocatechine in hops. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 76: 932-934.

Green, R.; Richards, M.; Tesker, M.C. 2004. Use of hop components in food. Application Number: 10/473985.

Greenrod, W.; Stockley, C.S.; Burcham, P.; Abbey, M.; Fenech, M. 2005. Moderate acute intake of de-alcoholised red wine, but not alcohol, is protective against radiation-induced DNA damage ex vivo - Results of a comparative in vivo intervention study in younger men. *Mutation Research*. 591 (1-2): 290-301.

Gronbaek, M.; Deis, A.; Sorensen, T.I.; Becker, U.; Schnohr, P.; Jensen, G. 1995. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *Br. Med. J.* 310: 1165-1169.

Guo, J.; Nikolic, D.; Chadwick, L.R.; Pauli, G.F.; Van Breemen, R.B. 2006. Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus*). *Drug metabolism and Disposition* 34: 1152-1159.

Gupta, S. 1999. Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis - focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis*. 143: 1-6.

Guyot, S.; Doco, T.; Souquet, J.M.; Moutounet, M. Drilleau, J.F. 1997. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var *kermeserrien*) skin and pulp. *Phytochem*. 44 (2): 351-357.

Haar, L.; Gallagher, J.S.; Kell, G.S. 1984. NBC/NRC Steam tables: Thermodynamic and transport properties and computer programmes for vapor and liquid states of water in SI units. Ed. Hemisphere publishing corporation. Washington, EEUU.

Hagerman, A. E.; Butler, L.G. 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*. 15 (6): 1795-1810.

- Halliwell, B.** 1995. Antioxidants: Elixirs of Life or Tonics for Tired Sheeps?, *Biochemist*. 17: 3-6.
- Hammerstone, J.F.; Lazarus, S.A. Mitchell, A.E.; Rucker, R.; Schmitz, H.H.** 1999. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 47 (2): 490-496.
- Hanton, S. D.** 2001. Mass spectrometry of polymers and polymer surfaces. *Chem. Rev.* 101 (2): 527-569.
- Harbone, J.B.** 1986. The natural distribution in angiosperms of antocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids. *Phytochem.* 25 (8): 1887-1894.
- Hayasaka, Y.; Waters E.J.; Cheynier, V.; Herderich, M.J.; Vidal, S.** 2003. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17 (1): 9-16.
- He, G.Q; Xiong, H.P.; Chen, Q.H.; Ruan, H.; Wang, Z.Y.; Traore, L.** 2005. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Zhejiang University Science*. 6B (10): 999-1004.
- Helma, K., Vaher, M.; Püsa, T.; Kamsol, K.; Orav, A.; Kaljurand, K.** 2007. Bioactive components of the hop strobilus: Comparison of different extraction methods by capillary electrophoretic and chromatographic methods. *J. Chromatogr A*. 1155: 222-229.
- Herrero, M.; Cifuentes A.; Ibañez, E.** 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chem.* 98: 136-148.
- Hidalgo Togores, J.** 2003. *Tratado de Enología*. Tomo1. Ed. Mundi-Prensa. pp.: 109-125, 162-166.
- Hmamouchi, M.; Es-safi, N.; Lahrichi, M.; Fruchier, A.; Essassi, E.M.** 1996. Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 47: 186-192.

Ho, Y.-C.; Liu, C.H.; Chen, C.N.; Duan, K.J.; Lin, M.T. 2008. Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Phytotherapy Res.* 22 (11): 1465-1468.

Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. 2002. High throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4437-4444.

Huang, D.J.; Ou, B.X.; Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

Hümmer, W.; Schreier, P. 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 1381-1398.

Iacopini, P.; Baldi, M.; Storch, P.; Sebastiani, L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Compos.* 21: 589-598.

Ivanova, V.; Stefova, M.; Vojnoski, B. 2009. Assay of the phenolic profile of Merlot wines from Macedonia: effect of maceration time, storage, SO₂ and temperature of storage. *Macedonian Journal of Chemistry and Clinical Engineering.* 28(2): 141-149.

Jackson, R.S. 2000. Wine, Health and Food. En: *Wine Science Principles, Practice, Perception* (Second Edition). Ed. Academic Press. 591-607.

Jadhav, S.J.; Nimbalkar, S.S.; Kulkarni, A.D.; Madhavi, D.L. 1996. Lipid oxidation in biological and food systems. En: *Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives*. Ed. D.L. Madhavi, S.S. Deshpande y D.K. Salunke, Marcel Dekker, Nueva York. EEUU. pp.: 5-64.

Jeong Ho, J.; Ju Sun, K.; Sam Sik, K.; Kun Ho, S.; Hyun Wook, C. and Hyun Pyo, K. 2010. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *J. Ethnopharmacol.* 127: 589-595.

Jiamsripong, P.; Mookadam, M.; Honda, T.; Khandheria, B.K.; Mookadam, F. 2008. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease: Part I. *Prev Cardiol.* 11 (3): 155-161.

Jovanovic, S.V.; Steenkens, S.; Tosic, M.; Marjanovic B., Simic, M.G. 1994. Flavonoids as anti-oxidants, *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 4846-4851.

Jung, S. H., Park H. S., Kim, K. S., Choi, W. H., Ahn, C. W., Kim, B. T., Kim, S. M., Lee, S., Ahn, S. M., Kim, Y. K. 2008. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J. Nutr. Biochem.* 19(6): 371-375.

Kac, J.; Zakrajsek, J.; Mlinaric, A.; Kreft, S.; Metk, F. 2007. Determination of xanthohumol in hops (*Humulus lupulus* L) by nonaqueous CE. *Electrophoresis.* 28 (6): 965-969.

Kaliora, A.C.; Dedoussis, G.V.Z.; Schmidt, H. 2006. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 187: 1-17.

Kammerer, D.; Claus, A.; Carle, R.; Schieber, A. 2004. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera*, L.) by HPLC-DAD-MS. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4360-4367.

Kaur, C.; Kapoor, H.C. 2001 Antioxidants in fruits and vegetables- the millenium's health. *Int. J. Food Sci.* 36: 703-725.

Karchesy, J.J.; Hemingway, R.W. 1986. Sequencing procyanidin oligomers by fast-atom-bombardment mass-spectrometry. *Anal. Chem.* 58 (12): 2563-2567.

Keevil, J. G.; Osman, H. E.; Reed, J. D.; Folts, J. D. 2000. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J. Nutr.* 130: 53-56.

Kennedy, J.A.; Saucier, C.; Glories, Y. 2006. Grape and wine phenolics: history and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3): 239-247.

Kirby, W.; Wheeler, R.E. 1980. Extraction of beer polyphenols and their assay by HPLC. *J. Inst. Brew.* 86 (1): 15-17.

Klatsky, A.L.; Armstrong, M.A. 1993. Alcoholic beverage choice and risk of coronary heart disease mortality: do red wine drinkers fare best? *Am. J. Cardiol.* 71: 467-469.

Klatsky, A.L.; Armstrong, M.A.; Freedman, G.D. 1986. Relation of alcoholic beverage use to subsequent coronary heart disease hospitalization. *Am. J. Cardiol.* 58: 710-714.

Klouche, M.; Rose-John S.; Schmiedt, W.; Bhakdi, S. 2000. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation.* 101 (15): 1799-1805.

Kono, H.; Rusyn, I.; Yin, M.; Gabele, E.; Yamashina, S.; Dikalova, A.; Kadiiska, M. B.; Connor, H. D.; Mason, R.P.; Segal, B.H.; Bradford, B.U.; Holland, S.M.; Thurman, R.G. 2000. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J. Clin. Invest.* 106: 867- 872.

Kou, Y.; Inaba, H.; Kato, T.; Tagashira, M.; Honma, D.; Kanda, T.; Ohtake, Y.; Amano, A. 2008. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *Journal of periodontology.* 79 (1): 174-180.

Krueger, C. G.; Treichel, P.M.; Folts, J.; Reed, J.D. 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5): 1663-1667.

Kubes, P., Suzuki M., Granger, D. N. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88 (11): 4651-4655.

Labanda, J.; Vichi, S.; Llorens, J.; López-Tamanes, E. 2009. Membrane separation technology for the reduction of alcoholic degree of a white model wine. *LWT- Food Science and Technology.* 42: 1390-1395.

Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissendré, P.L. 2001. Antioxidant capacities and phenolic levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3341-3348.

Langcake, J.L.; Price, R.J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinífera* and other members of Vitaceae as response to infection injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86.

Lazarus, S.A.; Adamson, G.E.; Hammerstone JF; Schmitz, H.H. 1999. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 47 (9): 3693-3701.

Lea, A.G.H. 1978. Phenolics of ciders - oligomeric and polymeric procyanidins. *J. Sci. Food Agric.* 29 (5): 471-477.

Lea, A.G.H.; Bridle, P.; Timberlake, C.F.; Singleton, V.L. 1979. Procyanidins of white grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30 (4): 289-300.

Lee, J.-C.; Kundu, J.K.; Hwang, D.M.; Na, H.K.; Surh, Y.J. 2007. Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF-kappaB and AP-1: IkappaB kinase and c-Jun-N-terminal kinase as respective potential upstream targets. *Carcinogenesis.* 28 (7): 1491-1498.

Li, J.J.; Gao, R.L. 2005. Should atherosclerosis be considered a cancer of the vascular wall?. *Medical Hypotheses.* 64: 694-698.

Libby, P.; Ridker, P.M. 2006. Inflammation and Atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology.* 48: 33-46.

Llaudy Fernández, M. C. 2006. Contribución al estudio de los factores que afectan a la astringencia del vino tinto. Tesis doctoral. Facultad de enología. Departamento de Bioquímica y biotecnología. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona.

Lovallo, W.R. 2005. Cardiovascular reactivity: Mechanisms and pathways to cardiovascular disease. *International Journal of Psychophysiology.* 58: 119-132.

Lu, T.; Pan, Y.; Kao, S.Y.; Li, C.; Kohane, I.; Chan, J.; Yankner, B. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429: 883-89.

Lupinacci, E.; Meijerink, J.; Vincken, J.P.; Gabriele, B.; Gruppen, H.; Witkamp, R.F. 2009. Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) is an efficient inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- α release in LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages and U937 human monocytes. *J. Agric. Food Chem.* 57 (16): 7274-7281.

Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. 1990. Fruit phenolics. Ed. CRC Press. Florida, EEUU. pp.: 1-95.

Madhavi, D.L.; Deshpande, S.S.; Salunke, D.K. 1995. Food Antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. Ed. D.L. Madhavi, S.S. Deshpande y D.K. Salunkhe, Marcel Dekker, Nueva York, EEUU. pp.: 1-5.

Magalhães, P.J.; Dostalek, P.; Cruz, J.M.; Guido, L.F.; Barros, A.A. 2008. The Impact of a xanthohumol-enriched hop product on the behavior of xanthohumol and isoxanthohumol in pale and dark beers: A pilot scale approach. *J. Inst. Brew.* 114 (3): 246-256.

Magalhães, P.J.; Guido, L.F.; Cruz, J.M.; Barros, A.A. 2007. Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1150 (1-2): 295-301.

Maier, T.; Schieber, A.; Kammerer, D.R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food chem.* 112: 551-559.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727-747.

Mann, L.B.; Folts, J.D. 2004. Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease. A review. *Pathophysiology.* 10: 105-112.

- Marín, F.R.; Perez-Alvarez, J.A.; Soler-Rivas, C.** 2005. Isoflavones as functional food components. *Studies in natural products chemistry*. Ed: Atta-ur-Rahman. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, Holanda. 32: 1177-1207.
- Masaki, H.; Atsumi, T.; Sakurai, H.** 1994. Hammameli tannin as a new potent active oxygen scavenger. *Phytochem.* 37: 337-343.
- McDonough, K. H.** 2003. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology.* 189:89-97.
- McMurrough, I.; McDowell, J.** 1978. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Anal. Biochem.* 91 (1): 92-100.
- Medina, I.; Martínez, J.L.** 1997. Dealcoholisation of cider by supercritical extraction with carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68: 14-18.
- Meier, P.M.** 1992. The reverse osmosis process for wine dealcoholization. *Aust NZ Grapegrow Winemak.* 348: 9-10.
- Mendelsohn, M.E.; Karas, R.H.** 1994. Estrogen and the blood vessel wall. *Current Opinion on Cardiology.* 9: 619-626.
- Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Helmrich, A.; Henderson, M.C.; Rodriguez, R.J.; Yang, Y.-H.; Deinzer, M.L.; Barnes, D.W.; Buhler, D.R.** 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 37 (4): 271-285.
- Mitra, S.; Goyal, T.; Mehta J.L.** 2011. Oxidized LDL, LOX-1 and Atherosclerosis. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 25: 419-429.
- Miyagi, Y.; Miwa, K.; Inoue, H.** 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am. J. Cardiol.* 80: 1627-1631.
- Molyneux, P.** 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 26: 211-219.
- Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A.** 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews.* 43 (2): 109-142.

- Morita, I.** 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. Prostaglandins and other Lipid Mediators. Molecular Biology of the Arachidonate Cascade. 68-69: 165-175.
- Nabata, T.; Morimoto S.; Koh, E.; Shiraishi, T.; Ogihara, T.** 1990. Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. Biochemistry International. 20 (3): 445-453.
- Narzib, L.; Miedaner, H.; Kern, E.; Düll, F.** 1988. Schankbiere, alkoholarme und alkoholfreie biere. Brauwelt. 128: 866-870.
- Natella, F.; Ghiselli, A.; Guidi, A.; Ursini, F.; Scaccini, C.** 2001. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. Free Radical Biology and Medicine. 30 :1036-44.
- Nigdikar, S. V.; Williams, N. R.; Griffin, B. A.; Howard, A. N.** 1998. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. Am. J. Clin. Nutr. 68: 258-265.
- Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo-Da Silva, J.M.; Laureano, O.** 2010. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon Grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. J. Agric. Food Chem. 58: 3591-3599.
- Ohnishi-Kameyama, M.; Yanagida, A.; Kanda, T.; Nagata, T.** 1997. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 11 (1): 31-36.
- Olas, B.; Kolodziejczyk, J.; Wachowicz, B.; Jedrejek, D.; Stochmal, A.; Oleszek, W.** 2011. The extract from hop cones (*Humulus lupulus*) as a modulator of oxidative stress in blood platelets. Platelets. 22 (5): 345-352.
- Oszmianski, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M.** 1996. Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. J. Agric. Food Chem. 44: 1712-1715.

Oszmianski, J.; Ramos, T.; Bourzeix, M. 1988. Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 259-262.

Pace-Asciak C.R.; Rounova, O.; Hahn, S.E.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M. 1996. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta.* 246 (1-2): 163-82.

Palma, M.; Piñeiro, Z.; Barroso, C.G. 2001. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *J. Chromatogr. A.* 921: 169-174.

Paoletti, T.; Fallarini, S.; Gugliesi, F.; Minassi, A.; Appendino, G.; Lombardi, G. 2009. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. *Eur. J. Pharmacol.* 620 (1-3): 120-130.

Parker, D. R.; McPhillips, J. B.; Derby, C. A.; Gans, K. M.; Lasater, T. M.; Carleton, R. A. 1996. High-density-lipoprotein cholesterol and types of alcoholic beverages consumed among men and women. *American Journal of Public Health.* 86:1022-1027.

Peinado, J.; de Lerma, N.L.; Moreno, J. 2009. Antioxidant activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximenez grapes at different stages of the off-wine drying process. *Food Chem.* 114 (3): 1050-1055.

Pellegrini, N.; Pareti, F. I.; Stabile, F.; Brusamolino, A.; Simonetti, P. 1996. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition.* 50: 209-213.

Peluso, M.R.; Miranda, C.L.; Hobbs, D.J.; Proteau, R.R.; Stevens, J.F. 2010. Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-Activated THP-1 monocytes: Structure-activity relationships and *In Silico* binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). *Planta Med.* 76: 1536-1543.

Peters, A. 2005. Particulate matter and heart disease: Evidence from epidemiological studies. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 207 (2): 477-482.

Pianet T.; Absalon C.; Vitry C.; Vivas N.; Vivas de Gaulejac N.; Nonier M.F. 2002. Structural mapping of grape procyanidin polymers, En: Proceedings of XXI International Conference on Polyphenols. Vol. 2, pp.: 451-452.

Pickering, G.J. 2000. Low- and reduced-alcohol wine: a review. *Journal of Wine Research*. 2: 129-144.

Pignatelli, P.; Ghiselli, A.; Buchetti, B.; carnevale, R.; Natella, F.; Germano, G. Fimognari, F.; Di Santo, S.; Lanti, L.; Violi, F. 2006. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis*. 188: 77-83.

Pilipovik, M.V.; Riverol, C. 2005. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. *J Food Eng.* 69: 437-441.

Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Nuñez, M.J. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2111-2117.

Poli, G., Sottero B., Gargiulo, S., Leonarduzzi, G. 2009. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*. 30 (3): 180-189.

Porter, L.J.; Hrstich, L.N.; Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidin and delphinidin. *Phytochem.* 25: 223-230.

Posadas, I., Terencio, M. C., Guillén, I., Ferrándiz, M. L., Coloma, J., Payá, M., Alcaraz, M. J. 2000. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 361 (1): 98-106.

Possemiers, S.; Bolca, S.; Grootaert, C.; Heyerick, A.; Decroos, K.; Dhooga, W.; De Keukeleire, D.; Rabot, S.; Verstraeta, W.; Van de Wiele, T. 2006. The prenylfalvonoid isoxanthohumol from hops (*humulus lupulus*) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine?. *J. Nutr.* 136:1862-1867.

Possemiers, S.; Rabot, S.; Espin, J.C.; Bruneau, A.; Philippe, C.; Gonzalez-Sarrias, A.; Heyerick, A.; Tomás-Barberán, F.A.; Keukeleire, D.D.; Verstraete, W. 2008. Eubacterium limosum activates isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L) into the potent phytoestrogen 8-Prenylnaringenin in vitro and in rat intestine. J. Nutr. 138: 1310-1316.

Pratt, D.E.; Hudson, B.J.F. 1990. Natural Antioxidant Not Exploited Commercially. En Food Antioxidants. Ed., B.J.F. Hudson. Elsevier Applied Science. Londres, Inglaterra. pp.: 171- 192.

Pródanov M.; Vacas, V.; Hernández, T.; Estrella, I. 2010. Improve methodology for chemical characterization of grape seeds extracts. En Polyphenols Communications 2010, Eds: A.Ageorges, V. Cheynier, P. Lefer y P. Sarni-Machado, vol. 2, T5.63, pp. 592-593, ISBN: 978-2-7380-1282-1.

Pródanov, M.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R.; López, F.; Güell, C. 2004. La técnica de separación por membranas semipermeables y su empleo en la industria vinícola. Tecnología del Vino. 16: 35-46.

Pródanov, M.; Vacas, V.; Hernández, T., Estrella, I.; Amador, B.; Winterhalter, P. 2012. Chemical characterisation of Malvar grape seeds (*Vitis vinifera* L.) by ultrafiltration and RP-HPLC-PAD-MS. Journal of Food Composition and Analysis (En revision: Ref. JFCA-S-12-00265)

Radomski, M. W., Palmer R. M., Moncada, S. 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. The Lancet . 2 (8567): 1057-1058.

Ramos, E.; Castañeda, B.; Ibañez, L.A. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev. Acad. Peru Salud. 15 (1): 42-46.

Reglero G. 2001. La extracción con fluidos supercríticos una tecnología interesante para la industria alimentaria española del presente y del futuro. Química e Industria. 517: 13-19.

Ribéreau-Gayon, P. 1964. Les composés phénoliques du Raisin et du vin II. Les flavonoides et les anthocyanosides. *Ann. Physiol. Vég.* 6: 211-242.

Ricardo da Silva J.M.; Rosec J.P.; Bourzeix M.; Heredia, N. 1990. Separation and quantitative-determination of grape and wine procyanidins by High-Performance Reversed Phase Liquid-Chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 53 (1): 85-92.

Rigaud, J.; Escribano-Bailón, M.T.; Prieur, C.; Souquet, J.M.; Cheynier, V. 1993. Normal-phase high-performance liquid-chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J. Chromatogr.* 654 (2): 255-260.

Rivas-Gonzalo, J. C. 2003. Analysis of anthocyanins. In: *Methods in Polyphenol analysis*. Eds. Santos-Buelga, C. and Williamson, G. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra. pp.: 338-353.

Robards, K.; Antolovich, M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst.* 122: 11-34.

Robertson, M.D. 2006. Food perception and postprandial lipid metabolism. *Physiology and Behavior.* 89: 4-9.

Rocha, J.T.; Hipólito, U.V.; Callera, G.E.; Yogi, A.; Filho, Mdos. A.; Bendhack, L.M.; Touyz, R.M.; Tirapelli, C.R. 2012. Ethanol induces vascular relaxation via redox-sensitive and nitric oxide-dependent pathways. *Vascular Pharmacology.* 56 (1-2): 74-83.

Rockenbach, I.I.; Rodrigues, E.; Gonzaga, L. V.; Caliari, V.; Genovese, M.I.; Schmidt Gonçalves, A. E. S.; Fett, R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. And *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chem.* 127: 174-179.

Rodrigo, R.; Castillo, R.; Carrasco, R. Huerta, P.; Moreno, M. 2005. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the *in vitro* antioxidant capacity of wine. *Life Sciences.* 76: 889-900.

Rodríguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano, J.L.; MartínezGascuña, J.; García Romero, E. 2006. Phenolic compounds in skins and

seeds of ten grape *Vitid vinifera* varieties grown in a warm climate. *J Food Compos Anal.* 19: 687-693.

Rodríguez, R.J.; Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 39: 437-445.

Romano, M.; Sironi, M.; Toniatti, C.; Polentarutti, N.; Fruscella, P.; Ghezzi, P.; Faggioni, R.; Luini, W.; Van Hinsbergh, V.; Sozzani, S.; Bussolino, F.; Poli, V.; Ciliberto, G.; Mantovani, A. 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 6 (3): 315-325.

Romeyer, F.M.; Macheix, J.J.; Goifon, J.P.; Reminiac, C.C.; Sapis, J.C. 1983. The bowning capacity of grapes II. Changes and importance of hidroxycinnamic acid, tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric Food Chem.* 31 (2): 346-349.

Ross R. 1999. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115–126.

Rothe, J.; Gehr G.; Loetscher, H.; Lesslauer, W. 1992. Tumor necrosis factor receptors- Structure and function. *Immunologic Research.* 11 (2): 81-90.

Roussis, I. G.; Lambropoulos, I.; Tzimas, P.; Gkoulioti, A.; Marinos, V.; Tsoupeis, D.; Boutaris, I. 2008. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food composition and Analysis.* 21: 614-621.

Ruiz-Rodriguez, A.; Fornari, T.; Hernández, E.J.; Señoráns, F.J.; Reglero, G. 2010. Thermo-dynamic modeling of dealcoholization of beverages using supercritical CO₂: application to wine samples. *Journal of Supercritical Fluids* 52 (2): 183-188.

Sägesser, M.; Deinzer, M. 1996. HPLC-ion spray-tandem mass spectrometry of flavonol glycosides in hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists.* 54: 129-134.

Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Vivas, N.; de Freitas, V.; Bourgeois, G. 1999. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1081-1090.

Sampson, J. J. 1924. Determination of the resistance of leukocytes. *Archives of internal medicine.* 34(4): 490-502.

Sánchez Álvarez, I. M. 2000. Evaluación del contenido de compuestos fenólicos en orujos de uva *Vitis vinifera* L. Trabajo fin de carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de albacete. Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal. Universidad de Castilla la Mancha.

Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1094-1117.

Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Remesy, C. 2002. Absorption and metabolism in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 56: 276-282.

Scheffer, P. G.; Teerlink, T.; Heine, R. J. 2005. Clinical significance of the physicochemical properties of LDL in type 2 diabetes. *Diabetología.* 48: 808-816.

Schobinger, U. 1986. Nonalcoholic wine – manufacturing processes and sensory aspects. *Mitteilungen Gebiete Lebensmittel Hygiene* 77 (1): 23-38.

Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91 (1-2): 21-40.

Schottelius, A. J.; Mayo, M. W.; Sartor, R. B.; Baldwin, A. S. 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem.* 274 (45): 31868-31874.

Schreier, P. 1979. Flavour composition of wines: a review. *CRC Food Sci. Nutr.* 12 (1): 59-111.

- Schroder, H.; Marrugat, J.; Fíto, M.; Weinbrenner, T.; Covas, M.I.** 2006. Alcohol consumption is directly associated with circulating oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*. 40: 1474-1481.
- Shaefer, O.; Humpel, M.; Fritzemeier, K.H.; Bohlmann, R.; Schleuning, W.D.** 2003. 8-Prenylnaringenin is a potent Eralpha selective phytoestrogen present in hops and beer. *Journal of Steroid Biochemistry. Molecular Biology*. 84: 359-360.
- Shahidi, F.; Naczk, M.** 1995. Antioxidant Properties of Food Phenolics. En *Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Ed. CRC Press. Florida, EEUU. pp: 403-437.
- Shanmuganayagam, D.; Warner, T.F.; Krueger, C.G.; Reed J.D.; Folts, J.D.** 2007. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 190: 135-142.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M.** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method. Enzymol*. 299: 152-178.
- Smith, F.** 2002. Engineering wine-techniques used to overcome problems in winemaking. *Aust NZ Grapegrow Winemak* 465: 71-74.
- Song, S., Ling-Hu, H., Roebuck, K. A., Rabbi, M. F., Donnelly, R. P., Finnegan, A.** 1997. Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. *Blood*. 89 (12): 4461-4469.
- Souquet, J.-M; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M.** 1996. Polymeric Proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem*. 43 (2): 509-512.
- Staško, A.; Brezová, V.; Mazúr, M.; Čertík, M.; Kaliňák, M.; Gescheidt, G.** 2008. A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. *LWT- Food Science and Technology*. 41: 2126-2135.

Stein, J. H.; Keevil, J. G.; Wiebe, D. A.; Aeschlimann, S.; Folts, J. D. 1999. Purple grape juice improves endothelial function and reduces susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 100: 1050-1055.

Stein, W. 1993. Reduction of the alcohol content of beer- comparison of methods. *Voedingsmiddelen Technology*. 26: 30-32.

Steinbrecher, U. P. 1987. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J. Biol. Chem.* 262(8) : 3603-3608.

Stevens, J.F.; Page, J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochem.* 65: 1317-1330.

Stevens, J.F.; Taylor, A.W.; Clawson, J.E.; Deinzer, M.L. 1999b. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2421-2428.

Stevens, J.F.; Taylor, A.W.; Nickerson, G.B.; Ivancic, M.; Henning, J.; Haunold A.; Deinzer, M.L. 2000. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochem.* 53: 759-775.

Stevens, J.F.; Taylor, A.W.; Deinzer, M.L. 1999a. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 832: 97-107.

Stocker, R.; O'Halloran, R.A. 2004. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. *Am J Clin Nutr.* 79 (1): 123-30.

Sugden, M. C.; Zariwala, M. G.; Holness, M. J. 2009. PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection. *Pharmacological Research*. 60: 141-150.

Sun, A.Y.; Simony, A.; Sun, G.Y. 2002. The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad. Bio. Med.* 32: 314-318.

- Sun, B. S.; Spranger, M. I.** 2005. Changes in phenolic composition of Tinta Miuda red wines after 2 years of ageing in bottle: effect of winemaking technologies. *Eur. Food Res. Technol.* 221(3-4): 305-312.
- Sun, B.S.; Belchior, G.P.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Spranger, M.I.** 1999. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *J. Chromatogr.* 841 (1): 15-121.
- Sun, B.S; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, M.I.** 1998. Critical factors of vainillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4267-4274.
- Surh, Y. J.; Chun, K. S.; Cha, H. H.; Han, S. S.; Keum, Y. S.; Park, K. K.; Lee, S. S.** 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutation Research.* 480-481: 243-268.
- Suzuki, H.; Shibano, K.; Okane, M.; Kono, I.; Matsui, Y.; Yamane, K.; Kashiwagi, H.** 1989. Interferon-gamma modulates messenger RNA levels of c-sis (PDGF-B chain), PDGF-A chain, and IL-1 beta genes in human vascular endothelial cells. *American Journal of Pathology.* 134 (1): 35-43.
- Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommes, J.** 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113: 1226-1233.
- Takashiba, S., Van Dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A. W., Shapira, L.** 1999. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infection and immunity.* 67(11): 5573-5578.
- Thies, M.; Fischer, R.** 1971. New color reaction for the microchemical detection and the quantitative determination of catechins. *Mikrochim. Acta.*1: 9-13.
- Thompson, J.; Thompson, P.D.** 2006. A systematic review of LDL apheresis in the treatment of cardiovascular disease *Atherosclerosis.* 189: 31-38.

- Tiarks A.E.; Meier C.E.; Flagler R.B.; Steynberg E.C.** 1992. Sequential extraction of condensed tannins from pine litter at different stages of decomposition. En: *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. Eds. Hemingway, R. W. y Laks, P. S. Plenum Press. New York, EEUU. pp.: 597-608.
- Tolnai, S.** 1975. A method for viable cell count. *Methods in Cell Science* 1 (1): 37-38.
- Tracey, K. J.; Cerami A.** 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annual Review of Cell Biology*. 9: 317-343.
- Trousdale, E.K.; Singleton, V.L.** 1983. Astilbin and engeletin in grapes and wine. *Phytochem.* 22: 619-623.
- Tsanga, C.; Higginsa, S.; Duthiea, G.G.; Duthiea, S.J.; Howiea, M.; Mullen, W.; Leana, M.E.J.; Crozier, A.** 2005. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 93: 233-240.
- Usseglio-Tomasset, L.** 1998. *Química enológica*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Cronin, M.T.D.; Mazura, M.; Telser, J.** 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
- Van Cleemput, M.; Heyerick, A.; Libert, C.; Swerts, K.; Philippé, J.; De Keukeleire, D.; Haegeman, G.; De Bosscher K.** 2009. Hop bitter acids efficiently block inflammation independent of GR α , PPAR α , or PPAR γ . *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (9): 1143-1155.
- Vanhoenacker, G.; Dermaux, A.; De Keukeleire, D.; Sandra, P.** 2001. Single-run capillary electrochromatographic analysis of hop acids and prenylated hop flavonoids. *J. Sep. Sci.* 24: 55-58.
- Vinson, J.A.; Teufel, K.; Wu, N.** 2001. Red wine, dealcoholized red wine, and specially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 156 (1): 67-72.

- Vivas, N.; Nonier, M.-F.; Vivas de Gaulejac, N.; Absalon, C.; Bertrand, A.; Mirabel, M.** 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 513 (1): 247-256.
- Vradis, I.; Flores, J. D.** 1993. Membrane separation processes for wine dealcoholization and quality improvement. En: Food flavors, ingredients and composition. G. Charalambous Ed., Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Waterhouse, A.L.; Lamuela-Raventos, R.M.** 1994. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochem.* 37: 571-573.
- Waterhouse, A.L.; Ignelzi, S.; Shirley, J.R.** 2000. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (4): 383-389.
- Wollny, T., Aiello, L., Di Tommaso, D., Bellavia, V., Rotilio, D., Donati, M. B., de Gaetano, G.; Iacoviello, L.** 1999. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 127: 747-755.
- Wu, D.; Cederbaum, A. I.** 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research and Health.* 27: 277-284.
- Wu, S.J.; Ng, L.T.** 2007. Tetrandrine inhibits proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (1): 59-62.
- Wulf, L.W.; Nagel, C.W.** 1980. Identification of flavonoids in Merlot and Cabernet Sauvignon wines. *J. Food Sci.* 45 (3): 479-484.
- Yang, Y.; Chien, M. J.** 2000. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 3990-3996.

Young-Chang, C.; Sung-Kyun, Y.; Hyun Jung, K.; Cheong-Weon, C.; Ik-Soo, L.; Bok Yun, K. 2010. Xanthohumol inhibits IL-12 production and reduces chronic allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* 10: 556-561.

Yu, W.; Yu-Cai, F.; Wang, W. 2012. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J Cell Biochem.* 113: 752-759

Yun, H. Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews in Neurobiology.* 10 (3-4): 291-316.

Zanoli, P.; Zavatti, M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 116: 383-396.

Zeihner, A. M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., Busse, R. 1995. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation Research.* 76 (6): 980-986.

Zhao, F.; Watanabe, Y.; Nozawa, H.; Daikonnya, A.; Kondo, K.; Kitanaka, S. 2005a. Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). *J. Nat. Prod.* 68 (1): 43-49.

Zhao, F.; Nozawa, H.; Daikonnya, A.; Kondo, K.; Kitanaka, S. 2003. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol. Pharm. Bull.* 26: 61-65

Zhao, G., Etherton, T. D., Martin, K. R., Vanden Heuvel, J. P., Gillies, P. J., West, S. G., Kris-Etherton, P. M. 2005b. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (3): 909-917.

Páginas Web

AESAN. <http://www.aesan.msc.es/>

Codex Alimentarius. <http://www.codexalimentarius.net/>

EFSA. <http://www.efsa.europa.eu/>

FDA. <http://www.fda.gov/>

Foodstandars. <http://www.foodstandards.gov.au/>

FOSHU. <http://www.foshu.com/>

Grace Davison Discovery Sciences:

<http://www.discoverysciences.com/product.aspx?id=6306>

ICEX.

http://www.winesfromspain.com/icex/cda/controller/pageGen/0,3346,1559872_6763355_6778152_0,00.html

OEMV. 2011a. <http://www.oemv.es/esp/españa-ha-arrancado-un-total-de-94003,09-hectáreas-en-las-tres-campañas-previstas-de-arranques-subsuencionados-por-la-actual-ocm-425k.php>

OEMV. 2011b. <http://www.oemv.es/esp/espectacular-aumento-del-consumo-de-tinto-de-verano-en-alimentación-frente-al-estancamiento-de-la-sangría-440k.php>

OIV. 2011. <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole#bilan>

Restek Chromatography Products. www.restek.com

The International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. <http://www.idf.org/webdata/docs/Metac>

World-Healt-Organization. "WHO" Cardiovascular diseases.

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/

Imagen portada: <http://www.elconocedor.com/notas/una-sana-costumbre.html>